

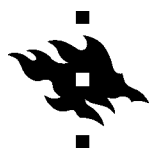
*CHLAMYDIA PNEUMONIAE* -INFEKTION KULKU KEUHKOEPITEELISTÄ  
MONOSYYTTEIHIN YHTEISSOLUVILJELMÄSSÄ

Visa-Alexi Reijonen  
Helsingin yliopisto  
Farmasian tiedekunta  
Farmaseuttisen biologian osasto

Lokakuu 2020



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Farmasian tiedekunta		Osasto/Sektion– Department Farmaseuttisten biotieteiden osasto
Tekijä/Författare – Author Visa-Alexi Reijonen		
Työn nimi / Arbetets titel – Title <i>Chlamydia pneumoniae</i> -infektion kulku keuhkoepiteelistä monosyytteihin yhteissoluviljelmässä		
Oppiaine / Läroämne – Subject Farmaseuttinen biologia		
Työn laji/Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma	Aika/Datum – Month and year Lokakuu 2020	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 63 sivua
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p><i>Chlamydia pneumoniae</i> on <i>Chlamydiae</i>-luokan sisällä <i>Chlamydiaceae</i>-heimoon kuuluva gram-negatiivinen, obligaatisti solunsisäinen patogeeni, joka aiheuttaa noin 5–10 % yleisistä keuhkokuumeista maailmanlaajuisesti. <i>C. pneumoniae</i> -infektiot ovat hoidettavissa antibiootein, mutta tällä hetkellä tautia vastaan ei ole rokotetta tai muuta ennaltaehkäisevää lääkitystä. <i>C. pneumoniae</i> on pystytty yhdistämään keuhkokuumeen lisäksi muun muassa ateroskleroosiin ja Alzheimerin tautiin. Tämä johtuu bakteerin kyvystä levitä ensisijaiselta infektiopaikaltaan – keuhkoista – infektoimaan sekundaarisia solukudoksia. <i>C. pneumoniae</i> pääsee siirtymään keuhkoepiteelistä verenkiertoon ja siellä valkosolujen, mm. monosyyttien, sisällä toisiin kudoksiin, kuten sydämen verisuonten sileään lihakseen.</p> <p>Infektioiden hoitoa vaikeuttaa <i>Chlamydia pneumoniae</i> -bakteerin kyky luoda persistenttejä, antibiootihoidolle resistenttejä muotoja. Aistiessaan stressitekijän, kuten <math>\beta</math>-laktaamiantibiootin tai interferoni <math>\gamma</math>-n, <i>C. pneumoniae</i> -bakteerit muuntuvat persistenttiin muotoon ja pystyvät muuttamaan takaisin monistuvaan muotoon stressitekijän poistuttua. <i>C. pneumoniae</i> -bakteereiden on myös huomattu muuttuvan persistenttiin muotoon edetessään infektoimaan monosyyttejä keuhkoepiteelistä. Mielenkiintoista tässä persistenssin muodossa on se, että se ei vaadi muita ärsykeitä persistenssin laukaisemiseksi monosyyttien tunkeutumisen lisäksi. Nämä persistenssimekanismit mahdollistavat latentit, hiljaiset ja toistuvat infektiot.</p> <p>Tämän pro gradu -tutkielman tarkoituksena oli tutkia keuhkoepiteelisolujen (HL-solujen) ja erilaistumattomien monosyyttien (THP-1-solujen) yhteisviljelmää, ja hyödyntäen Kortesojan tutkimusryhmineen esittelemää magneettista solujen erottelua, löytää heidän protokollalleen positiivinen kontrolli <i>Chlamydia pneumoniae</i> -bakteerin internalisoitumisen THP-1-soluihin estämiseksi. Yhteissoluviljelmässä tutkittiin erilaisia aineryhmiä, muun muassa <i>Schisandra chinensis</i> -kasvista eristettyjä lignaaneja, MAPK-inhibiittoreita ja <math>\beta</math>2,2-aminohappojohdannaisia ja niiden vaikutusta estää <i>C. pneumoniae</i> -bakteerin siirtymistä HL-soluista THP-1-soluihin.</p> <p>Tilastollinen relevanssi todettiin JNK-inhibiittori SP600125-, MAPKAP-kinaasi-2-inhibiittori SB203580- ja ERK1/2-inhibiittori FR180204-yhdisteillä. Yhdisteet estivät <i>Chlamydia pneumoniae</i> -bakteerin internalisaatiota THP-1-soluihin yhteissoluviljelmässä <math>61,05 \pm 16,63</math> % (<math>p = 0,0001</math>), <math>54,06 \pm 16,02</math> % (<math>p = 0,0002</math>) ja <math>36,76 \pm 10,33</math> % (<math>p = 0,009</math>) vastaavasti. SP600125- ja SB203580-yhdisteillä todettiin tilastollisesti merkittävä inhiboiva vaikutus internalisaatioon THP-1-soluihin myös yksöissoluviljelmässä (<math>39,98 \pm 18,92</math> %, <math>p = 0,026</math> ja <math>37,89 \pm 19,47</math> %, <math>p = 0,035</math> vastaavasti), kun taas FR180204-yhdisteellä ei ollut tilastollista merkittävyyttä, vaikka se vaikuttikin yksöissoluviljelmässä inhiboivasti THP-1-soluihin internalisaatioon <math>27,53 \pm 21,17</math> %.</p> <p>Tutkituista yhdisteistä vain MAPK-inhibiittoreilla oli inhiboiva vaikutus <i>C. pneumoniae</i> -bakteerin THP-1-soluihin internalisoitumiseen. Näistä tehokkaimmin internalisaatiota esti JNK-inhibiittori SP600125. JNK-välitteisen viestinnän on epäilty olevan osallisena <i>Chlamydia</i> -suvun bakteerien infektioiden, mutta tutkimustietoa asiasta on vain vähän. Tämän pro gradu -tutkielman tulokset vahvistavat epäilyä JNK-entsyymin osallisuudesta klamydiainfektioissa, mutta kyseisen entsyymin varsinaisen merkityksen <i>C. pneumoniae</i> -bakteerin infektiocyklissä selvittäminen vaatii lisätutkimuksia.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Chlamydia pneumoniae</i> , keuhkoepiteelisolu, monosyytti, yhteissoluviljelmä, solujen erottelu, MAPK-inhibiittori, schisandriini		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Sähköinen kirjasto		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Ohjaajat: Leena Hanski ja Maarit Kortesoja		



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Pharmacy		Osasto/Sektion– Department Division of pharmaceutical biosciences	
Tekijä/Författare – Author Visa-Aleksi Reijonen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title The migration of <i>Chlamydia pneumoniae</i> infection from lung epithelia to monocytes in a coculture model			
Oppiaine / Läroämne – Subject Pharmaceutical biology			
Työn laji/Arbetets art – Level Master's thesis		Aika/Datum – Month and year October 2020	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 63 pages
<p>Tiivistelmä/Referat – Abstract</p> <p><i>Chlamydia pneumoniae</i> is a gram negative, obligate intracellular pathogen, which belongs into the <i>Chlamydiaceae</i> family in the <i>Chlamydiae</i> class. It causes approximately 5–10 % of community acquired pneumonias worldwide. <i>C. pneumoniae</i> infections can be treated with antibiotics but there is no vaccine nor other preventive medication at the current moment. <i>C. pneumoniae</i> has been linked to different diseases besides pneumonia, for example atherosclerosis and Alzheimer's disease. This is due to the bacteria's ability to spread out from the primary site of infection – the lung – to a secondary infection site. <i>C. pneumoniae</i> can release itself from the lung epithelia to the blood stream and infect white cells, such as monocytes. These white cells take the bacteria into these secondary sites of infection, for example vascular smooth muscle tissue.</p> <p>Making the treatment of these infections even harder is the fact, that <i>Chlamydia pneumoniae</i> can produce persistent forms of itself, which are immune to antibiotic treatment. When the bacteria sense a stress factor, for example the presence of a <math>\beta</math>-lactam antibiotic or interferon <math>\gamma</math>, they start producing these persistent forms called aberrant bodies. When the stress factor is removed, the bacteria can switch back to their replicating form and start infecting the tissues again. It is also known, that <i>C. pneumoniae</i> bacteria will trigger persistence when the bacteria migrate from lung epithelia into monocytes. Interestingly the onset of this mode of persistence does not require any other triggers besides the invasion of the monocyte. These persistence mechanisms enable latent, quiet, and recurring infections.</p> <p>This master's thesis aimed to study the coculture of lung epithelial (HL cells) and monocytes (THP-1 cells), and by utilising the magnetic separation method presented by Kortesoja et al, to find a positive control compound in the prevention of <i>Chlamydia pneumoniae</i> internalisation into the THP-1 cells for said protocol. In these cocultures the inhibitory effect of different compound groups such as lignans present in <i>Schisandra chinensis</i> plant, MAPK-inhibitors, and <math>\beta</math>2,2-amino acid derivatives in <i>C. pneumoniae</i> migration from HL cells to THP-1 cells was assessed.</p> <p>Statistic relevance was observed in JNK inhibitor SP600125, MAPKAP-kinase-2 inhibitor SB203580, and ERK1/2 inhibitor FR180204 compounds. These compounds inhibited the internalisation of <i>Chlamydia pneumoniae</i> into THP-1 cells in the cell coculture by <math>61,05 \pm 16,63</math> % (<math>p = 0,0001</math>), <math>54,06 \pm 16,02</math> % (<math>p = 0,0002</math>), and <math>36,76 \pm 10,33</math> % (<math>p = 0,009</math>) respectively. SP600125 and SB 203580 compounds also had an inhibitory effect on the internalisation of <i>C. pneumoniae</i> into the THP-1 cells in a cell monoculture (<math>39,98 \pm 18,92</math> %, <math>p = 0,026</math> and <math>37,89 \pm 19,47</math> %, <math>p = 0,035</math> respectively), whereas FR180204 had no statistical significance, even though it inhibited the internalisation of <i>C. pneumoniae</i> into the THP-1 cells in cell monoculture by <math>27,53 \pm 21,17</math> %.</p> <p>From the compounds used in the experiments, only MAPK inhibitors had an effect in inhibiting the <i>C. pneumoniae</i> internalisation into the THP-1 cells. The most potent compound in said inhibition was the JNK inhibitor SP600125. JNK pathway has been thought to take part in chlamydial infections but only little research has been done. The results of this master's thesis' experiments support the thought of JNK enzyme taking part in chlamydial infections but determining how exactly it affects the infection cycle of <i>C. pneumoniae</i> bacteria still needs further investigation.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Chlamydia pneumoniae</i> , lung epithelium, monocyte, cell coculture, cell separation, MAPK-inhibitor, schisandrin			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Electronic library			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Supervisors: Leena Hanski and Maarit Kortesoja			

## SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO .....	1
2	<i>CHLAMYDIAE</i> -LUOKAN BAKTEEREISTA YLEISESTI.....	2
2.1	<i>Chlamydiaceae</i> -heimon bakteereiden elinkierto.....	3
2.2	<i>Chlamydiaceae</i> -heimon bakteereiden genomi.....	4
2.3	<i>Chlamydiaceae</i> -infektiot .....	5
2.3.1	Isäntäsolun pinnalle kiinnittyminen ja soluun tunkeutuminen .....	6
2.3.2	Ravintorikkaalle alueelle eteneminen ja ravintoaineiden hankkiminen.....	8
2.3.3	Isäntäsolun vasteiden muuntelu .....	9
2.3.4	Isäntäsolusta vapautuminen .....	11
2.4	<i>Chlamydiaceae</i> -heimon persistenssi .....	12
2.4.1	$\beta$ -laktaamiantibioottien indusoima <i>Chlamydia</i> -suvun persistenssi.....	13
2.4.2	Interferoni- $\gamma$ :n indusoima <i>Chlamydia</i> -suvun persistenssi .....	15
3	<i>CHLAMYDIA PNEUMONIAE</i> .....	17
3.1	<i>Chlamydia pneumoniae</i> -bakteerin historiaa .....	17
3.2	<i>Chlamydia pneumoniae</i> -infektiot.....	18
3.3	Keuhkokuumediagnostiikka ja <i>Chlamydia pneumoniae</i> -infektion toteaminen.....	19
3.4	Keuhkokuumeen ja <i>Chlamydia pneumoniae</i> -infektioiden hoito .....	21
3.5	<i>Chlamydia pneumoniae</i> -infektioiden haasteet ja mahdolliset ratkaisut .....	22
4	TAVOITTEET .....	24
5	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	26
5.1	Tutkimuksissa käytetyt yhdisteet .....	26
5.2	Käytetyt solulinjat .....	29
5.3	<i>Chlamydia pneumoniae</i> -kanta .....	29
5.4	HL-solujen infektointi .....	30
5.5	Immunofluoresenssivärjäys .....	30
5.6	HL-THP-1-yhteissoluviljelmä .....	31
5.7	Uusien infektiivisten bakteerisolujen muodostumista mittaava koe.....	32
5.8	<i>Chlamydia pneumoniae</i> -bakteerin esikäsittely yhdisteillä, sekä internalisaatiokokeet THP-1-soluilla.....	33
5.9	<i>Chlamydia pneumoniae</i> -bakteerin esikäsittely yhdisteillä, sekä internalisaatiokokeet HL-soluilla .....	33
5.10	DNA:n eristäminen .....	34
5.11	<i>Chlamydia pneumoniae</i> -bakteerien määrän kvantitointi qPCR- menetelmällä.....	34
6	TULOKSET.....	36
6.1	Infektion onnistumisen, sekä atsitromysiinin ja schisandriinien vaikutuksen tutkiminen immunofluoresenssivärjäyksellä .....	36
6.2	Atsitromysiinin ja schisandriinien vaikutus <i>C. pneumoniae</i> -bakteerin kulkeutumiseen HL-soluista THP-1-soluihin .....	39
6.3	Atsitromysiinin, U0126-yhdisteen ja schisandriinien vaikutus <i>Chlamydia pneumoniae</i> -bakteerin internalisaatioon THP-1-soluihin.....	41

6.4	Atorvastatiinin, $\beta^{2,2}$ -aminohappojohdannaisten, mentoli- ja mentoniyhdisteiden, sekä MAPK-inhibiittoreiden vaikutus <i>Chlamydia pneumoniae</i> -bakteerin internalisaatioon THP-1-soluihin.....	42
6.5	MAPK-inhibiittorien (SP600125, SB203580 ja FR180204) vaikutus <i>C. pneumoniae</i> -bakteerin kulkeutumiseen HL-soluista THP-1-soluihin .....	45
6.6	MAPK-inhibiittorien (SP600125, SB203580 ja FR180204) vaikutus esikäsitellyiden <i>C. pneumoniae</i> -bakteereiden internalisaatioon HL-soluihin .....	46
6.7	Atsitromysiinin, SP600125-, SB203580- ja FR180204-entsyymi-inhibiittorien, sekä schisandriinien vaikutus <i>C. pneumoniae</i> -bakteerin jälleeniinfektiokykyyn.....	48
6.8	Tulosten yhteenveto .....	49
7	POHDINTA .....	52
8	JOHTOPÄÄTÖKSET .....	57
9	KIRJALLISUUS .....	58

## KÄYTETYT LYHENTEET

AB	Aberrant body (persistentti bakteerimuoto)
apoE4	Apolipoproteiini E4
CAP	Ei-sairaaloissa saatu keuhkokuume
Caprin2	Syttoplasmiseen aktivaatioon/vapautumiseen liitetty proteiini 2
cGAMP	Syklinen GMP-AMP
cGAS	Syklinen GMP-AMP-syntaasi
CHX	Sykloheksimidi
CPAF	<i>Chlamydia</i> -proteasaa muistuttava toiminallinen faktori
EB	Elementary body (infektiivinen bakteerimuoto)
EGFR	Epidermin kasvutekijäreseptori
EPHA2	Efriinireseptori A2
Erk	Extracellular signal regulated protein kinase (proteiinikinaasiperhe)
FBS	Fetal bovine serum
FGFR	Fibroblastikasvutekijäreseptori
Gp96	Glukoosin säätelemä proteiini 96
GS15	15 kilodaltonin Golgi-SNARE-proteiini
GSK3 $\beta$	Glykogeenisyntaasikinaasi-3- $\beta$
HLA-A2	Humaani leukosyyttivasta-aine A2
HMG-CoA	3-hydroksi-3-metyyliglutarylikoentsyymi-A
HSP60	60 kDa heat shock -proteiinin
HSPG	Hepariini-sulfaatti-proteoglykaani
IDO	Indoliamiini-2,3-dioksigenaasi
IgA/IgG/IgM	Immunoglobuliini A/G/M
Inc (X)	Inkluusiokalvoproteiini X (jossa (X) = luku- ja/tai kirjainyhdistelmä)
IFN $\beta/\gamma$	Interferoni- $\beta$ tai interferoni- $\gamma$
IFU	Inkluusioita muodostava yksikkö
MACPF	Solukalvon hyökkäysproteiinikompleksi
MAPK	Mitogeeni-aktivoituva proteiinikinaasi
MIF	Mikroimmunofluoresenssi

MOI(X)	Multiplicity of infection, jossa $((X) = \frac{\text{bakteerien määrä}}{\text{infektoitavien solujen määrä}})$
MOMP	Major outer membrane protein (bakteerien kalvoproteiini)
N-WASP	Neuraalinen Wiskott-Aldrich syndrooman proteiini
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (Soluselvitymisestä vastaava proteiinikompleksi)
OmpB	Ulkokalvoproteiini B
PCR	Polymeraasiketjureaktio
PDI	Protiinidisulfidi-isomeraasi
PI3K	Fosfoinositidi-3-kinaasi
PKCδ	Proteiinikinaasi Cδ
Pmp21	Polymorfinen kalvoproteiini 21
Rac1	Ras-sukuinen C3-botuliinitoksiinisubstraatti 1
RB	Reticulate body (jakautuva bakteerimuoto)
RTK	Reseptorityroosikinaasi
SNX(X)	Järjestevän neksiiniperheen proteiini (X) (jossa (X) = järjestevä neksiiniperheen proteiinin järjestysnumero)
STX(X)	Syntaksiiniproteiini (X) (jossa (X) = syntaksiiniproteiinin järjestysnumero)
T(X)SS	Tyypin (X) erityisjärjestelmä (jossa (X) = erityisjärjestelmän järjestysnumero 1–5)
TarP	Translocated actin-recruiting phosphoprotein ( <i>Chlamydia</i> -sukuisten bakteerien efektori)
TLR2/TLR4	Toll-like receptor 2 tai toll-like receptor 4 (ihmissolujen immuunivasteeseen liittyvä kalvoproteiini)
TRAF3	TNF-reseptoriin liitetty faktori 3
VAMP(X)	Vesikkeleihin liitetty kalvoproteiini 4 (jossa (X) = kalvoproteiinin järjestysnumero)

## 1 JOHDANTO

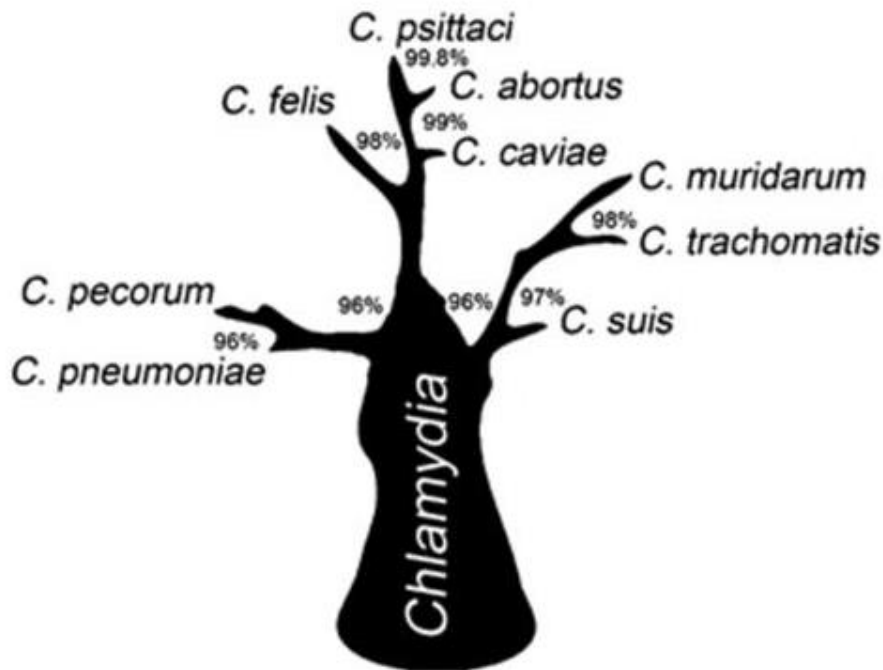
*Chlamydia pneumoniae* on *Chlamydiae*-luokan sisällä *Chlamydiaceae*-heimoon kuuluva gram-negatiivinen, solunsisäinen patogeeni, joka aiheuttaa yleisistä keuhkokuumeista (CAP, *community acquired pneumonia*) noin 5–10 % (Elwell ym. 2016; Hanski ja Vuorela 2014). Monet *Chlamydia*-suvun bakteeri-infektiot voivat olla oireettomia tai niitä ei tunnisteta, jolloin epäonnistunut tai laiminlyöty hoito voivat johtaa krooniseen tulehdukseen (Ouellette ym. 2016). *C. pneumoniae* -infektioita voidaan hoitaa DNA:ta, RNA:ta tai proteiinisynteesiä häiritsevillä antibiooteilla, kuten kinoloneilla, tetrasykliineillä tai makrolideilla (Hammerschlag 2002; Hanski ja Vuorela 2014). Kyseinen bakteeri ei ole kuitenkaan herkkä trimetopriimille tai sulfonamideille, joilla *C. trachomatis* -infektioita voidaan puolestaan hoitaa (Hanski ja Vuorela 2014). Ensisijainen antibiootti *C. pneumoniae* -infektion hoitoon on atsitromysiini, jolla ei kuitenkaan olla saatu hoidettua valkosoluja infektoimaan edenneitä infektioita täysin, ei edes pitkinä kuureina. Ongelmana on myös se, että yleisimmin hengitystieinfektioita hoidettaessa käytetään  $\beta$ -laktaamiantibiootteja, kuten penisilliiniä, jotka ennemminkin aiheuttavat persistentin infektion, sen tehokkaan häätämisen sijaan, mikäli taudinaiheuttajana on *C. pneumoniae*.

*Chlamydia*-sukuiset bakteerit kykenevät siirtymään alkuperäiseltä infektiokohdalta verenkiertoon, jossa ne siirtyvät valkosolujen sisällä muualle elismistöön (Hanski ja Vuorela, 2014). Tunnetuin löydöksistä on 1990-luvulla ateroskleroottisesta valtimosta löytynyt *C. pneumoniae* -bakteeristo, joka herätti keskustelua kyseisen bakteerilajin mahdollisesta osasta olla kyseisen sairauden riskitekijä (Maas ym. 1998). *C. pneumoniae* -bakteereita on myös löydetty muun muassa Alzheimerin tautiin liitetyiltä aivojen alueilta, joskin näyttö johtopäätösten vetämiseksi onkin riittämätöntä (Shima ym. 2010). Jos yhteys tauteihin on kuitenkin olemassa, täsmälääkkeen kehittäminen infektioiden häätämiseksi vähentäisi terveydenhuollollista taakkaa (Hanski ja Vuorela, 2014). Tämän pro gradu tutkimuksen tarkoituksena on löytää yhdisteryhmiä, jotka toimisivat mahdollisesti *C. pneumoniae* -bakteerien siirtymistä keuhkoepiteelisoluista valkosoluihin estäen kyseisten solutyypin yhteissoluviljelmässä.



## 2 CHLAMYDIAE-LUOKAN BAKTEEREISTA YLEISESTI

Kaikki *Chlamydiae*-luokan bakteerit ovat gram-negatiivisia, solunsisäisiä patogeeneja ja symbiontteja, joiden isäntäeliöt ovat alkueläimistä nisäkkäisiin, kuten ihmisiin (Elwell ym. 2016). Näiden bakteerien selviytyminen on riippuvaista isäntäeliön metaboliasta. Isäntäsolun sisällä *Chlamydia*-suvun bakteerit elävät ja monistuvat isäntäsolun solukalvosta muodostetussa rakkulassa, jota kutsutaan inkluusioksi. Kyseisen luokan bakteereilla on hyvin marginaalinen määrä peptidoglykaania ja lipopolysakkaridirikkas ulkokalvo (Hammerschlag 2002). Tutkituin *Chlamydia*-luokan heimoista on *Chlamydiaceae*-heimo, johon tämä pro gradu -kirjoitelma keskittyy (Elwell ym. 2016). Tähän heimoon kuuluu 11 eläimille ja ihmisille patogeenista lajia, joista ihmisille huomattavimmat patogeeniset lajit ovat *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci* ja *Chlamydia pecorum*, joista kaksi ensin mainittua ovat tutkituimmat ja eniten ihmisinfektioita aiheuttavat (Elwell ym. 2016; Hammerschlag 2002) (kuva 1). *Chlamydiaceae*-heimon bakteereille ei olla pystytty kehittämään rokotetta ihmiselle, toisin kuin joillekin eläinlajeille (Muthy ym. 2012). Ihmisillä infektiot ovat kuitenkin hoidettavissa antibiootein (Elwell ym. 2016). Ongelmaksi on kuitenkin koitunut bakteerien taipumus muodostaa antibioottihoitoon reagoimattomia, persistenttejä bakteerisoluja, jotka pitävät yllä hiljaista tulehdusta, ja häiritsevät isäntäsolun omia signaalintireittejä (Hammerschlag 2002; Hanski ja Vuorela 2014).



Kuva 1. *Chlamydia*-suvun bakteerien taksonomia ja 16r-RNA:n vastaavuus lajien välillä prosenttilukuina. (Mukaillen Stephens ym. 2009)

## 2.1 *Chlamydiaceae*-heimon bakteereiden elinkierto

*Chlamydiaceae*-heimon bakteereille kuuluu tyypillinen, kaksivaiheinen elinkierto, joka vaihtelee infektiivisten bakteerisolujen (EB, *elementary body*) ja lisääntyvien bakteerisolujen (RB, *reticulate body*) välillä (Elwell ym. 2016). Näistä EB-muodon bakteerit selviävät karuissakin olosuhteissa (Nelson, 2012). Niillä on itiön kaltainen soluseinä, joka koostuu rikkisilloin (disulfidisilloin) ristiin sidotusta proteiiniverkosta, joka puolestaan tekee bakteerisoluista osmoottisesti stabiileja, sekä vastustaa fysikaalista stressiä. Aiemmin EB-muodon uskottiin olevan metabolisesti inaktiivinen (Nelson, 2012), mutta nykyään niiden aineenvaihdunnan tiedetään olevan riippuvainen D-glukoosi-6-fosfaatista (Omsland ym. 2014). Proteomiikalla on löydetty proteiineja, jotka vastaavat *C. trachomatis* -bakteerin yleisestä metaboliasta ja glukoosikataboliasta (Saka ym. 2011). Tutkimuksessa todettiin, että EB-muodon bakteerit ovat ladattu tyypin III erityysjärjestelmällä (T3SS, *type III secretion system*) ja efektoreilla, joilla bakteerit välittävät viestin isäntäsoluun kerätäkseen glukoosia, jonka puolestaan uskotaan olevan välttämätön energialähde isäntäsolun infektoimiseksi ja muutokseen EB-muodosta RB-muotoon.

RB-muodot puolestaan vastaavat isäntäsolun sisäisen inkluusion sisäisestä elämästä (Elwell ym. 2016). EB-muotoisen bakteerin tunkeutuessa isäntäsoluun, ristiin sidotut proteiinirakenteet häviävät, jonka katsotaan olevan merkki RB-muodoksi muuttumisesta (Nelson, 2012). RB-muotoisten bakteerien tehtävänä on ravinteiden hankkiminen ja monistuminen. Nämä solut ilmentävät paljon geenejä, jotka koodaavat proteiineja, joiden tehtävänä on vastata ATP:n tuotannosta (esim. V-tyypin ATP-syntaasit), proteiinisynteesistä (esim. ribosomaaliset proteiinit) ja ravinteiden kuljettamisesta (esim. nukleotiditransportteriproteiinit) (Saka ym. 2011). Lisäännyttyään RB-muodon bakteerit rakentavat itselleen EB-muodolle tyypillisen proteiini kuoren ja vapautuvat solusta lyysaamalla isäntäsolun tai eksosytoosin omaisesti rikkomatta isäntäsolua (Wolf ym. 2000). Jälkimmäinen vapautumistapa mahdollistaa niin sanotut hiljaiset infektiot (Hammerschlag 2002).

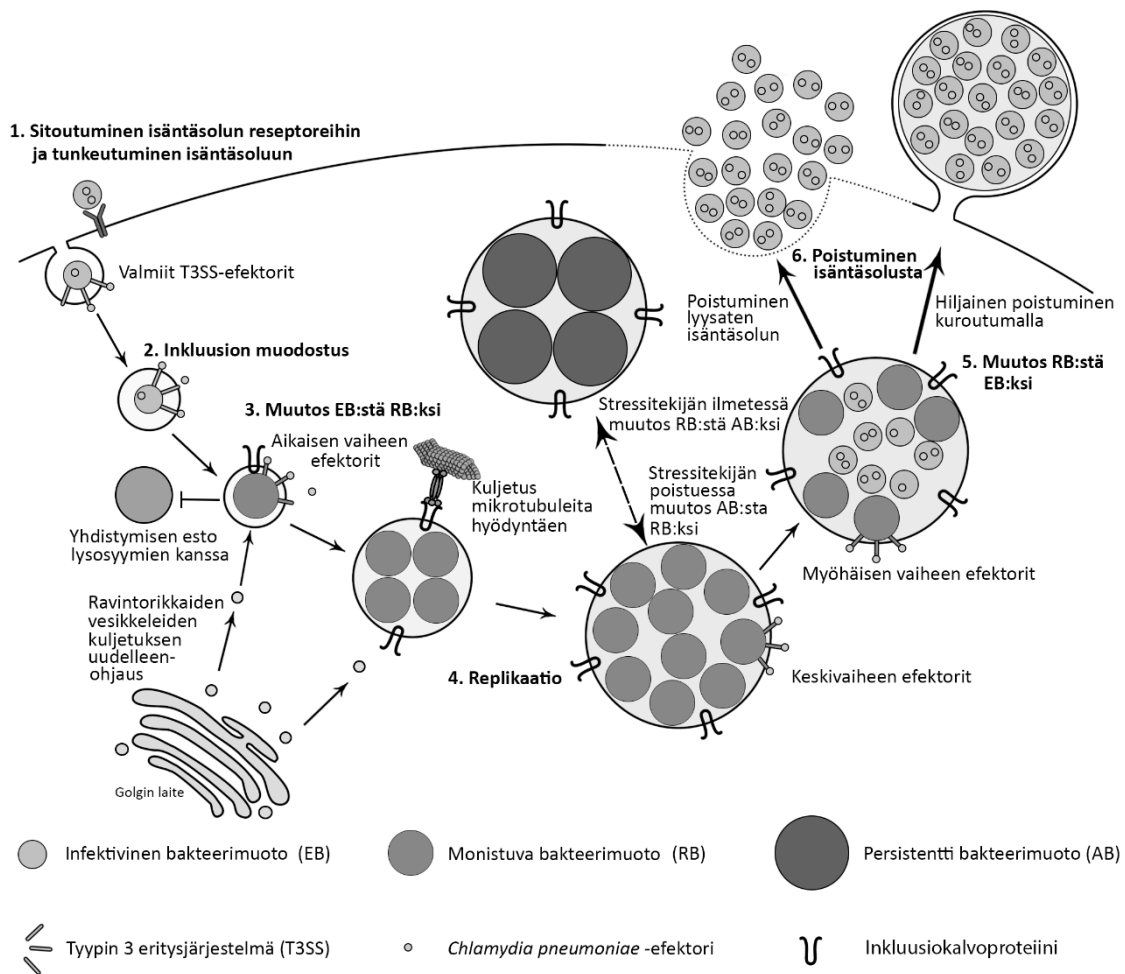
## 2.2 *Chlamydiaceae*-heimon bakteereiden genomi

*Chlamydiaceae*-bakteeriheimon genomi on minimaalinen – vain noin 1,0–1,2 miljoonaa emäsparia – sillä ne ovat sopeutuneet isäntäsolun sisäiseen elämään (Elwell ym. 2016; Roulis ym. 2015). *Chlamydia*-suvun bakteerit ovat pystyneet pienentämään genomiaan poistamalla tarpeettomia geenejä, jotka vastaavat esimerkiksi ravintoaineiden muokkaamisesta, sillä isäntäsolun sisällä, isäntäsolu tarjoaa bakteereille tarvittavat ravinteet, kuten aminohapot (Stephens ym. 1998). Tämän heimon sisällä eri lajien genomista noin kaksi kolmannesta koodaavat vastaavanlaisia geenejä (Elwell ym. 2016). Nämä geenit ovat vastuussa solunsisäisistä elämäntavoista, kuten isäntäsoluun tunkeutumisesta. *Chlamydia*-lajeilla on erittäin vähän, jos ollenkaan restriktio-, modifikaatio- tai DNA:n poimimisesta vastaavia geenejä. Tämä saattaa selittää sen, miksi lajien välinen DNA:n vaihto on erittäin vähäistä ja jokainen laji infektoi hyvin spesifisti tiettyjä lajeja ja kudoksia. Lajien genomissa eroavaisin on suuren vaihtelun alue (*plasticity zone*), johon on koodattu muun muassa kullekin suvulle tyypillisten virulenssitekijöiden, sytotoksiinien, solukalvon hyökkäysproteiinien (MACPF, *membrane attack complex/perforin protein*), ja fosfolipaasi D:n geenit (Bachmann ym. 2014). Lajin mukaan *Chlamydia*-suvun suurin vaihtelun alueet ovat 18 000–81 000 emäsparia.

Noin 10 % *Chlamydia*-suvun bakteerien genomista koodaa virulenssiektoreita (Elwell ym. 2016). Nämä efektorit kuljetetaan erinäisin erityysjärjestelmin niiden vaikutuskohtiin: bakteerin pinalle tyypin V erityysjärjestelmällä (T5SS, *type V secretion system*), isäntäsolun sisäisen inklusion sisälle tyypin II erityysjärjestelmällä (T2SS, *type II secretion system*), tai isäntäsolun sytosoliin tai inklusiokalvon pinnalle tyypin III erityysjärjestelmällä (T3SS, *type III secretion system*).

### 2.3 *Chlamydiaceae*-infektiot

*Chlamydiaceae*-heimon bakteerit infektoivat ensisijaisesti limakalvoja (Hammerschlag 2002). Infektion kulkuun kuuluu isäntäsolun limakalvolle kiinnittyminen, solunsisäiset inklusion muodostaminen, inklusiossa monistuminen ja isäntäsolusta vapautuminen (Elwell ym. 2016). Yksi tällainen sykli kestää yleensä noin 48–72 tuntia, josta noin ensimmäisen 8 tunnin aikana tapahtuu muuntuminen EB-muodosta RB-muodoksi, 24 tunnin sisällä bakteerit ovat monistuneet, sekä 48 tunnin sisällä inklusio on kypsynyt ja bakteerit ovat pääosin muuttuneet takaisin EB-muotoon (Hammerschlag 2002). Kuvassa 2 on kuvattu *Chlamydiaceae* -bakteeriheimon tyypillisen infektion kiertokulku.



Kuva 2. *Chlamydiaceae*-bakteeriheimon infektiokulun.

### 2.3.1 Isäntäsolun pinnalle kiinnittyminen ja soluun tunkeutuminen

Lajin mukaan *Chlamydiaceae*-heimon bakteerien kiinnittymis- ja internalisaatiomekanismit vaihtelevat ja tapahtumaketju riippuu vahvasti kyseisestä bakteerilajista ja infektoitavasti isäntäsolusta (Elwell ym. 2016). Tämän uskotaan olevan todennäköinen syy sille, miten bakteereiden taipumus infektoida hyvinkin spesifisti tiettyä isäntää ja kudosta on kehittynyt.

Niin *C. pneumoniae*-, kuin *C. trachomatis*- ja *C. muridarum*-bakteerien kiinnittyminen isäntäsolun pintaan on kaksivaiheinen (Elwell ym. 2016). Bakteerit kiinnittyvät aluksi löyhemmin heparaani-sulfaatti-proteoglykaaniin (HSPG, *heparan sulfate proteoglycans*) OmpB (*outer membrane protein B*) -välitteisesti, jonka jälkeen ne kiinnittyvät

vahvemmin isäntäsolun reseptoreihin (Hegemann ja Moelleken, 2012; Mehlitz ja Rudel 2013). *C. pneumoniae* -bakteerin tiukempaa isäntäsoluun kiinnittymistä on tutkittu vähemmän, mutta ilmeisesti polymorfinen kalvoproteiini 21 (Pmp21, *polymorphic membrane protein 21*) kiinnittyy EGF-reseptoriin (EGFR, *epidermal growth factor receptor*), joka on osallisena myös *C. trachomatis* -bakteerin kiinnittymisessä. EGFR:n aktivoituminen puolestaan johtaa Erk1/2 (*extracellular-signal-regulated kinase 1/2*) -aktivaatioon, joka saa aikaan solun sisäisen viestinnän (Mehlitz ja Rudel 2013). Tämän lisäksi tiedetään, että *C. trachomatis* kiinnittyy MOMP (*major outer membrane protein*) -välitteisesti mannoosi- ja mannoosi-6-fosfaattireseptoreihin, sekä Ctad1-invasiivivälitteisesti  $\beta^1$ -integriiniin (Mehlitz ja Rudel 2013; Stallmann ja Hegemann 2016). Soluun tunkeutumisen aikana myös reseptorityroosiinikinaasit (RTK, *receptor tyrosine kinase*) osallistuvat soluviestintään. *C. trachomatis* -bakteerit hyödyntävät myös efriniireseptori A2:en (EPHA2, *EPH receptor A2* tai *ephrin type-A receptor 2*) kiinnittymistä (Subbarayal ym. 2015), kun taas *C. pneumoniae* -bakteerin uskotaan hyödyntävän apolipoproteiini E4:ä (apoE4) viestinnässään (Gérard ym. 2008). On huomattu myös, että apoE4-ekspression muutokset eivät vaikuta *C. trachomatis* -bakteerin kiinnittymiseen isäntäsoluun. Myös proteiinidisulfidi-isomeraasin (PDI) uskotaan olevan osallisena monen *Chlamydia*-suvun bakteerin tunkeutumisessa isäntäsoluihin (Conant ja Stephens 2007), vähentäen disulfidisiltoja adhesiineissa, isäntäsolun reseptoreissa ja/tai T3SS:ssä (Elwell ym. 2016).

Isäntäsolun pintaan kiinnittyttyään *Chlamydia*-suvun bakteerit laukaisevat aktiinin uudelleenmuotoilun, joka aikaansaa nopean internalisaation (Hackstadt 2012). Solurangan ja solukalvon muutoksista vastaavat efektorit injisoidaan isäntäsoluun T3SS:n avulla. Yksi näistä efektoreista on esimerkiksi TarP (*translocated actin-recruiting phosphoprotein*), joka vastaa aktiinin nukleoimisesta ja niputtamisesta. Jokaisen patogeenisen *Chlamydia*-lajin on todettu hyödyntävän TarP-efektoria infektoissaan. Bakteerit hyödyntävät isäntäsoluun tunkeutumisessa Rho-perheen GTPaaseja, jotka säätelevät aktiinin polymerisaatiota (Elwell ym. 2016). Eri *Chlamydia*-lajit hyödyntävät eri GTPaasia, esimerkiksi *C. trachomatis* hyödyntää Rac1-proteiinia (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) (Carabeo ym. 2004). Aktiinin polymerisaation lisäksi myös solukalvoa muotoillaan hyödyntäen isäntäsolun tekijöitä, kuten esimerkiksi kaveoliinia ja klatriinia

(Elwell ym. 2016). Näistä klatriinia hyödyntää *C. trachomatis*, kun taas *C. pneumoniae* -bakteerin tunkeutumisen isäntäsoluun on todettu olevan klatriinista riippumatonta (Korhonen ym. 2012). *Chlamydia pneumoniae* bakteereiden isäntäsoluun tunkeutumisen uskotaankin olevan riippuvainen kolesterolin ja sfingomyeliinirikasta isäntäsolun solukalvon alueista.

### 2.3.2 Ravintorikkaalle alueelle eteneminen ja ravintoaineiden hankkiminen

Tunkeutuessaan isäntäsoluun onnistuneesti, *Chlamydia*-suvun bakteerit muodostavat itselleen isäntäsolun solukalvosta solun omia rakenteita muistuttavan rakkulan, eli inkluusion (Elwell ym. 2016). Bakteeri-inkluusiot kuljetetaan mikrotubuleita pitkin mikrotubulusten järjestelykeskukseen, Golgin laitteen läheisyyteen, jossa pienemmät, yksittäiset inkluusiot yhdistyvät isommiksi inkluusioiksi (Kokes ja Valdiva 2012; Richards ym. 2013). Kyseinen prosessi vaatii mikrotubulusten polymerointia, sekä moottoriproteiinin ja kinaasin toimintaa. Vaikka prosessi hyödyntää dynaktiini-kompleksia, *Chlamydia*-suvun bakteerit eivät kuitenkaan hyödynnä p50 dynamiiniä, jonka tehtävänä on sitoa kuljetettava aine mikrotubuluksiin. Tämän uskotaan viittaavan siihen, että jotkin bakteerin efektorit matkivat kyseisen osan toimintaa.

Isäntäsoluun tunkeuduttuaan *Chlamydiaceae*-heimon bakteereiden on vältettävä syntyneen inkluusion yhdistyminen isäntäsolun haitallisten rakenteiden, kuten lysosomien, kanssa (Elwell ym. 2016). Tavoitteena on puolestaan edesauttaa inkluusion yhdistymistä hyödyllisten osien, kuten ravintorikkaiden eksosyyttisten vesikkeleiden, kanssa. Tähän tiedetään osallistuvan ainakin kolme fuusiotekijäperhettä: RAB-GTPaasit, fosfoinositidilipidikinaasit ja (trans-Golgi-)SNARE-proteiinit. Näistä ensimmäisenä mainittu perhe vastaa ravinnon hankinnasta inkluusion läheisyyteen (Damiani ym. 2014). RAB4 ja RAB11 hankkivat transferrinivälitteisesti rautaa; RAB6, RAB11 ja RAB14 lipidejä Golgin laitteen välityksellä; kun taas RAB39 välityksellä hankitaan lipidejä muualta. Eri *Chlamydiaceae*-heimon bakteerit hyödyntävät eri RAB-proteiineja (esim. RAB6 on liitetty vain *C. trachomatis*-bakteeriin, kun taas RAB10 on liitetty vain *C. pneumoniae*-bakteeriin).

Fosfoinositidilipidikinaaseista Golgin laitteen inositolipolyfosfaatti-5-fosfaasi OCRL1, tuottaa bakteereille fosfatidyyli-inositoli-4-fosfaattia, joka naamioi bakteriinkluusion Golgin laitteen erilliseksi osaksi (Elwell ym. 2016). SNARE-proteiineista syntaksiini 6 ja 10 (STX6 ja STX10) (Kabeiseman ym. 2013; Lucas ym. 2015), vesikkeleihin liitetty kalvoproteiini 4 (VAMP4, *vehicle associated membrane protein 4*) (Kabeiseman ym. 2013), sekä 15 kilodaltonin Golgi-SNARE (GS15) -proteiinit osallistuvat ravintoaineiden hankkimiseen Golgin laitteen välityksellä (Pokrovskaya ym. 2012). Puolestaan vesikkeleihin liitetyt kalvoproteiinit 3, 7 ja 8 estävät yhdistymisen lysoosmien kanssa (Elwell ym. 2016). Järjestelvän neksiiniperheen (SNX) proteiinien SNX5 ja SNX6 interaktio inkluusiokalvoproteiini E:n (IncE) kanssa häiritsee isäntäsolun omia viestintäjärjestelmiä, estäen sen kuljetusjärjestelmiä, joka puolestaan edistää bakteerikasvua (Aeberhard ym. 2015).

### 2.3.3 Isäntäsolun vasteiden muuntelu

Solunsisäisten patogeenien yksi tärkeimmistä elinehdoista on oikein ajoitettu isäntäsolun kuolema ja sitä säätelevien mekanismien hallitseminen (Elwell ym. 2016). Liian aikaisin tuhoutuva isäntäsolu rajoittaa replikaatiosyklien määrää, kun taas liian pitkään venytetty solusta vapautuminen kuluttaa ravinteet loppuun. *Chlamydia*-suvun bakteerien on huomattu pidentävän isäntäsolujen solusykliä, luoden itselleen paremman mahdollisuuden replikoitua. Eri *Chlamydiaceae*-heimon edustajilla on todettu erilaisia mahdollisia vaikutuskohtia *in vitro*. Esimerkiksi *C. pneumoniae* -bakteerit häiritsevät mikrotubuleiden toimintaa T3SS-välitteisesti CopN-efektorivälitteisesti, tarkoituksenaan pitkittää ravintoaineiden saantia sille otollisimmassa solusyklin vaiheessa (Nawrotek ym. 2014). Kuitenkaan ei olla täysin varmoja siitä, tapahtuuko tätä *in vivo* -infektioissa. Vaikka *C. trachomatis* -bakteeritkin hyödyntävät T3SS:ä, niiden CopN-efektorit eivät sitoudu tubuliiniin, vaan niillä on edellä mainitusta eroava tarkoitus bakteerin infektiocyklissä.

Isäntäsolu säätelee ohjattua solukuolemaansa (apoptoosia) erilaisten signaaliketjujen välityksellä ja näin *Chlamydia*-suvun bakteerien on mahdollista vaikuttaa sen eri osaluoiisiin pysäyttääkseen kyseisen signaloinnin (Elwell ym. 2016). Näistä reiteistä kui-



tenkin reseptorityroosikinaasivälitteinen reitti näyttäisi olevan tärkeimpien klamydiapatogeenien vaikutuskohde. Bakteerit sitoutuvat RTK:hin ja aktivoivat MAPK-ERK- (*mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase*) sekä fosfoinositidi-3-kinaasivälitteistä (PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*) selviytymisviestintää. *C. trachomatis* ja *C. muridarum* hyödyntävät MAPK-ERK-välitteistä signalointia fibroblastikasvutekijäreseptorien (FGFR, *fibroblast growth factor receptor*) kautta (Elwell ym. 2016; Kim ym. 2011), kun taas *C. pneumoniae* hyödyntää Pmp21:n sitoutumista EGFR:än aktivoiden PI3K:n (Mölleken ym. 2013). Myös *C. trachomatis* aktivoi PI3K:ta EPHA2-välitteisesti (Subbarayal ym. 2015). ERK-aktivaatio lisää EPHA2-tuotantoa, joka yhä edistää solun selviämissignaaleja. *C. pneumoniae* -bakteerien inkluusiokalvoproteiini 1027 (Inc Cpn1027) sitoutuu  $\beta$ -kateniini-WNT-reitin, Caprin2- (sytoplasmiseen aktivaatioon/vapautumiseen liitetty proteiini 2, *cytoplasmic activation/proliferation-associated protein 2*) ja glykogeenisyntaasikinaasi-3- $\beta$  (GSK3 $\beta$ , *glycogen synthase kinase 3  $\beta$* ) -proteiineihin aktivoiden  $\beta$ -kateniini-välitteistä selviytymisgeenien tuotantoa (Flores ja Zhong 2015). Vaikka *Chlamydia*-infektoiden aikana tapahtuu muun muassa DNA:n kaksoiskierteen rikkoutumisia, infektoidut solut eivät kuitenkaan etene apoptoosiin, vaan niiden on huomattu vastustavan soluille luontaisista ja ulkoisista ärsykkeistä johtuvaa – kuten p53 (*tumor protein p53*) ja proteiinikinaasi C $\delta$  (PKC $\delta$ , *protein kinase C $\delta$* ) -välitteistä – solukuolemaa (Elwell ym. 2016).

Infektoidessaan isäntäsolun *Chlamydia*-suvun bakteerit laukaisevat myös inflammatorisen vasteen (Elwell ym. 2016). Eri reseptorien aktivoituminen lisää inflammaatiota edistävien sytokiinien, kemokiinien, ynnä muiden välittäjäaineiden tuotantoa kutsuen paikalle valkosoluja. Edellä mainittuihin reseptoreihin kuuluvat muun muassa TLR2–4 (*toll-like receptor 2–4*) -reseptorit, joista esimerkiksi TLR2 tunnistaa peptidoglykaanin, kun taas TLR4 tunnistaa bakteerisen LPS:n ja 60 kDa heat shock -proteiinin (HSP60) (Nagarajan 2012). Infektiossa myös syklinen GMP-AMP-syntaasi (cGAS, *cyclic GMP-AMP synthase*) tunnistaa solulimassa olevan DNA:n ja sitoutuessaan siihen, se lisää toisiolähteti cGAMP:n (*cyclic GMP-AMP*) muodostumista, joka aktivoi STING-proteiinia (Nagarajan 2014). STING-proteiinin aktivaatio puolestaan lisää tyypin I interferonien (IFN) ekspressiota tehostaen immuunipuolustusta. Infektioissa bakteerien on siis taisteltava näitä immuunivasteita vastaan. *C. pneumoniae* estää IFN $\beta$ -tuotannon TNF-

reseptoriin liitetyn faktori 3 (TRAF3, *tumour necrosis factor receptor-associated factor 3*) -siganaalimolekyylejä pilkkomalla todnäköisesti lajilleen erityisellä proteaasilla (Nagarajan 2014; Wolf ja Fields 2013). *Chlamydia trachomatis* -bakteerin on puolestaan todettu vähentävän typpioksidin (NO) tuotantoa kääntäen iNOS tuotannon vaihtoehtoiseen polyaminituotantoon (Abu-Lubad ym. 2014). Tämä vähentää verisuonten laajenemista, estäen valkosolujen kulkeutumista infektiopaikalle. Kyseisen mekanismin uskotaan olevan yleistettävissä kaikkiin *Chlamydia* -suvun lajeihin.

#### 2.3.4 Isäntäsolusta vapautuminen

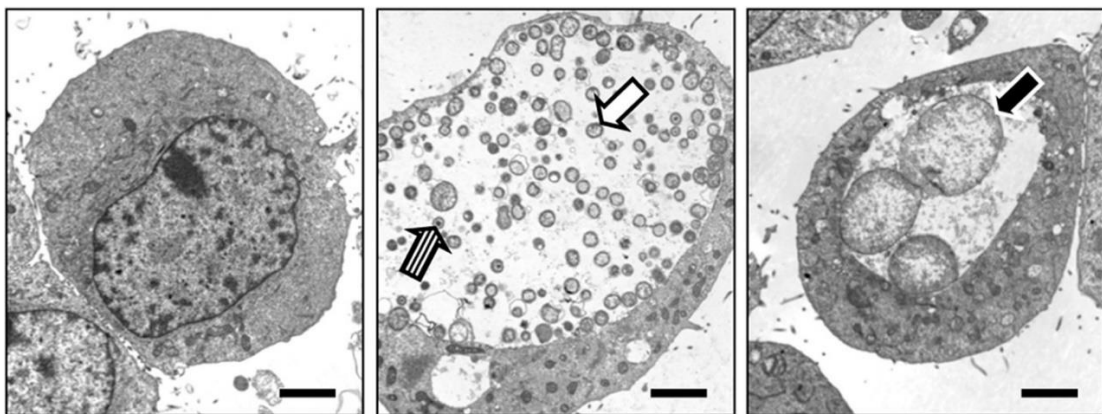
*Chlamydia* -suvun bakteerit voivat poistua isäntäsolusta joko lyysaten sen, tai eksosytoosia muistuttavalla mekanismilla (Hybiske ja Stephens 2007). Lyyttisesti vapautuminen tapahtuu bakteerien rikkomalla inkluusiokalvon, tumakalvon ja puhkaisemalla isäntäsolun solukalvon kalsiumvälitteisesti, lyysaten lopullisesti isäntäsolun. Proteaasi-inhibiittorit hidastavat tai estävät isäntäsolusta lyysaamalla poistumisen täysin, joten todennäköisesti *Chlamydia*-suvun bakteerit hyödyntävät proteaaseja lyyttisessä vapautumisessa. Viimeiseen vaiheeseen osallistuu T2SS-efektori – *Chlamydia*-proteaasia muistuttava toiminallinen faktori (CPAF, *Chlamydia protease-like activity factor*), joka valmistelee bakteerit poistumaan isäntäsolusta (Elwell ym. 2016).

Toinen, eksosytoosia muistuttava poistumiskeino, joka pitää isäntäsolun eheänä, hyödyntää useita isäntäsolun mekanismeja, muokaten isäntäsolun solukalvoa ja vapauttaen inkluusion solun ulkopuolelle (Hybiske ja Stephens 2007). Tapahtumaan tarvitaan muun muassa aktiinin polymerisaatiota, RHO-A GTPaasia, neuraalista Wiskott-Aldrich syndrooman proteiinia (N-WASP, *neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*), sekä myosiini II:ta ja myosiinifosfataasijärjestelmän osia (Chin ym. 2012). Hyödyntäen tätä poistumistietä *Chlamydia*-suvun bakteerit välttävät inflammaatiota edistävien yhdisteiden vapautumisen solusta, joka puolestaan suojaa EB:itä immunitetin kehittymiseltä seuraaville mahdollisille isäntäsoluluille (Elwell ym. 2016). Jotteivat bakteerit infektoisi samoja isäntäsoluja uudestaan, aiemmin infektoitujen solujen pintarakenteita muokataan, jotta ne pystytään tunnistamaan. Muun muassa *C. trachomatis* -infektoidut solut karsivat glukoosin säätelämä proteiini 96:a (Gp96, *glucose regulated protein 96*), joka

puolestaan säätelee proteiinidisulfidi-isomeraasia (Karunakaran ym. 2015). PDI on osana isäntäsoluun tunkeutumista (kappale 2.3.1.), joten jälleeninfektioita ei pääse tapahtumaan (Conant ja Stephens 2007).

#### 2.4 *Chlamydiaceae*-heimon persistenssi

Vaikka *Chlamydia*-suvun bakteereilla ei ole todettu muille bakteerisukuvuille tyypillistä, eri sukujen välistä, poikittaista, kliinisesti merkittävien resistenssigeenien geenisiirtoa, on kuitenkin kyseisen bakteerisuvun ongelmaksi noussut persistenssi (Panzetta ym. 2018). Persistenssillä tarkoitetaan infektion tasoa, jossa isäntäeliön omat puolustusmekanismit eivät voi hävittää infektoita ja saattaa johtaa jatkuviin vaurioihin ajan kuluessa (Hammerschlag 2002). Kyky muodostaa persistenttejä muotoja isäntäeliön elimistössä uskotaan olevan osana kaikkia *Chlamydiaceae*-heimon bakteereita. Näitä *Chlamydia*-sukuisten bakteerien persistenttejä muotoja kutsutaan aberranteiksi partikkeleiksi (AB, *aberrant body*) (Hanski ja Vuorela, 2014). Ne ovat muodoltaan huomattavasti RB- ja EB-muotoja suurempia (kuva 3). Persistentissä tilassa olevat bakteerit saattavat olla isäntäeliössä kuukausista jopa vuosiin aiheuttamatta selviä oireita (Hammerschlag 2002).



Kuva 3. *Chlamydia trachomatis* -infektoituja HeLa-soluja (kohdunkaulan syöpäsoluja). Vasemmanpuoleisin kuva on infektoimaton kontrolli, keskimmäinen kuva on infektiokontrolli ja oikeanpuoleisin kuva näyttää infektoidun HeLa-solun amoksisilliinin läsnäollessa. Valkoinen nuoli osoittaa RB-, raidallinen nuoli osoittaa EB- ja musta nuoli osoittaa AB-bakteerimuotoa. (Mukaillen Kintner ym. 2014)

Persistenssiä on tutkittu useilla eri *Chlamydia*-suvun bakteereilla (Panzetta ym. 2018). *C. trachomatis*-bakteerilla on löydetty vahva yhteys trakooman ja lantioseudun tulehdusten, sekä vahvahko yhteys artriitin kehittymiselle (Hammerschlag 2002). *C. pneumoniae* -bakteerilla on todettu vahvahko yhteys astman, kohtalainen yhteys artriitin ja ateroskleroosiin, sekä sillä uskotaan olevan yhteys Alzheimerin ja MS-taudin kehittymiselle. Tämän uskotaan johtuvan *Chlamydia*-sukuisten bakteerien kyvystä siirtyä alkupe-  
räiseltä infektiopaikalta verenkierron mukana, valkosolujen sisällä toisiin kudoksiin alun perin infektoidun kudoksen lisäksi (Hanski ja Vuorela, 2014). Todisteet *in vivo* -persistenssiä on saatu tutkimalla itse infektoituneita kudoksia, joista on löydetty AB-bakteereita (Borel ym. 2007; Panzetta ym. 2018). Mahdollisia havainnointikeinoja ovat antigeenitutkimukset, mikroskopointi tai PCR (polymeraasiketjureaktio) -menetelmät, mutta etenkin *C. pneumoniae* -bakteerin latentin infektion havainnoiminen on osoittautunut hankalaksi (Hammerschlag 2002). Tämän takia myös antibioottien todellisen tehon määrittäminen on osoittautunut haastavaksi. Monet tutkijat ovat onnistuneet löytämään eri *Chlamydia*-suvun bakteerien AB-muotoja erilaisista kudoksista immunokultaelektronimikroskopiolla (Borel ym. 2007; Panzetta ym. 2018). *In vivo* tutkimusten lisäksi persistenssiä on tutkittu *in vitro*, tuottamalla persistenttejä muotoja muun muassa antibiootein, sekä interferoni- $\gamma$ :lla (Ouellette ym 2016; Panzetta ym. 2018; Skilton ym 2009).

#### 2.4.1 $\beta$ -laktaamiantibioottien indusoima *Chlamydia*-suvun persistenssi

Ensimmäiset *Chlamydia*-suvun *in vitro* persistenssitutkimukset tehtiin lisäämällä  $\beta$ -laktaamiantibioottia – penisilliiniä – elatusliuokseen 1990-luvulla (Beatty ym. 1994). Näissä tutkimuksissa huomattiin, että bakteerit eivät enää kääntyneet RB-muodosta EB-muotoon, vaan sen sijaan alkoivat muodostaa muodoltaan poikkeavia AB-muotoja. Kun antibiootti poistettiin elatusliuoksesta, palautuvat bakteerisolut ennalleen ja aloittivat replikaatiosyklinsä. Myöhemmissä tutkimuksissa on huomattu, että toinen penisilliini-antibiootein tuotetun persistenssin piirre on 16s-ribosomaalisen RNA:n kertyminen bakteerisoluihin, sekä DNA-replikaation vain osittainen hiljentyminen (Skilton ym. 2009). Myöskään *Chlamydia*-suvun bakteereiden lisääminen jo penisilliiniä sisältävään elatusliuokseen ei estä bakteereiden internalisaatiota, eikä inklusion muodostumista. Vi-

deomikroskopiolla on huomattu AB-bakteereiden muuttuvan eriaikaisesti RB-muotoiseksi penisilliinin läsnä ollessa, mahdollisesti suotuisampien elinolosuhteiden tunnistamiseksi. Noin 10–20 tuntia penisilliinin poiston jälkeen bakteerit palaavat normaaliin elinkiertoonsa, mutta osa bakteereista inkluusiossa pysyy AB-muotoisina.

Phillips-Campbell ym. (2012) loi *in vivo* -mallin, jossa *C. muridarum* -bakteeri saatettiin persistenttiin muotoon elävissä hiirissä. Tätä mallia hyödyntäen Phillips-Campbell ym. (2014) huomasi tutkimuksessaan, että *C. muridarum* -bakteerin altistuttua  $\beta$ -laktaamiantibiootti amoksisilliinille, suositelluimman antiklamydiaalisen antibiootin, atsitromysiinin, teho oli heikentynyt. Hoito atsitromysiinillä epäonnistui 9 % hiiristä, joilla oli amoksisilliinilla persistenteiksi *C. muridarum* -infektioiksi saatettu infektio. Tämä viittaa siihen, että penisilliini-indusoitu persistenssi lisää *Chlamydia*-suvun bakteerien resistenssiä myös niihin muuten tehoavia antibiootteja kohtaan *in vivo*.

Kintner ym. (2014) tutkivat *C. trachomatis* -bakteerin persistenssiä kliinisessä käytössä olevilla penisilliinantibiooteilla (G-penisilliini, V-penisilliini, amoksisilliini, ampicilliini, karbenisilliini ja piperasilliini), kefalosporiineilla (kefotaksamiini ja keftriaksooni), sekä tetrasykliinillä fysiologisilla pitoisuuksilla. Tutkimusryhmä huomasi, että mikään kyseisistä  $\beta$ -laktaamiantibiooteista (penisilliinit ja kefalosporiinit) ei kyennyt estämään inkluusion muodostumista isäntäsoluun edes satakertaisilla pitoisuuksilla tavanomaiseen seerumin pitoisuuteen verrattuna. Kaikki inkluusiot olivat penisilliineille altistetuilla bakteereilla aiempien tutkimusten kuvailujen mukaan kuitenkin pieniä ja sisälsivät morfologisesti poikkeavia AB-muotoja bakteerista. Kefalosporiineille altistetut bakteerit eivät taas muodostaneet normaalista poikkeavia inkluusioita. Erona penisilliinantibiooteilla ja kefalosporiineilla oli myös se, että jo tavanomaisella seerumipitoisuudella penisilliinantibiootit vähensivät *C. trachomatis* -bakteerin infektiivisyyttä >95 %, kun taas kefalosporiineilla ei ollut juurikaan vaikutusta tähän. Tämä viittaa siis siihen, että  $\beta$ -laktaamiantibiootit laukaisevat toisistaan poikkeavan persistenssireaktion riippuen siitä, mihin ryhmään ne kuuluvat.

Wolf ym. (2000) laatimassa tutkimuksessa todettiin, että *C. pneumoniae* -bakteerin persistentti muoto on kuitenkin vähemmän elinkelpoisen tai huonompi toipumaan persis-

tentistä tilasta, kuin *C. trachomatis*-bakteerin. Tutkimuksessa kyseisiä bakteerilajeja inkuboitiin 48 tuntia 50 µg/ml ampisilliinia sisältävässä elatusliuoksessa ja 72 tuntia antibiootin poiston jälkeen *C. pneumoniae*-bakteerin määrä oli vain 0,22 % alkuperäiseen inokulumiin verrattuna, kun taas vastaava luku *C. trachomatis*-bakteerilla oli 86,7 %.

#### 2.4.2 Interferoni-γ:n indusoima *Chlamydia*-suvun persistenssi

Interferoni-γ on T-lymfosyyttien ja NK (natural killer) -solujen erittämä, immuunivastetta säätelevät sytokiini, joka on osallisena isäntäorganismien taistelussa patogeeneja vastaan (Panzetta ym. 2018). Aluksi IFNγ:n huomattiin vähentävän *Chlamydia psittaci*-bakteerin infektiivisyyttä ja kasvua humaaneissa uroepiteelisoluissa. IFNγ:lla tiedettiin tuolloin olevan antiviraalinen vaikutus ja tämän löydöksen uskottiin toteavan IFNγ:lla olevan lisäksi antimikrobinen vaikutus *Chlamydia*-suvun bakteereihin. Nopeasti tämän jälkeen kuitenkin huomattiin IFNγ:n todellakin vähentävän kyseisen bakteerisuvun replikaatiota, mutta EB-bakteereiden sijaan *C. trachomatis*-bakteeri tuotti isäntäsolujen sisään morfologisesti poikkeavia muotoja, joiden todettiin olevan persistenttejä AB-muotoja.

IFNγ:n tiedetään lisäävän indoliamiini-2,3-dioksigenaasi (IDO) -ekspressiota, joka on osallisena tryptofaanin metaboloinnissa (Ouellette ym. 2016). Isäntäsolun sisäiseen elämään sopeutuneet *Chlamydia*-suvun bakteerit ovat tryptofaaniauksotrofeja ja saavat biosynteesiinsä tarvitsemansa tryptofaanin isäntäsolun sytosolista tai lysosomien hajoustuotteena. Kyseisen bakteerisuvun proteiineista suurin osa (~80 %) sisältää tryptofaania ja arviolta 0,96 % proteiinien aminohapposisällöstä on tryptofaania *C. pneumoniae*-bakteerilla. IFNγ-välitteisen persistenssin onkin todettu johtuvan tryptofaanivarastoiden vähentymisestä, sillä IFNγ:n läsnäollessa IDO-mutanteissa soluissa tai tryptofaania elatusliuokseen lisättäessä, *Chlamydia*-suvun bakteerit eivät ole laukaisseet persistenssiä. Myöskään IFNγ:n lisäys ei vaikuta bakteerien elinkiertoa, jos elatusliuokseen lisätään IDO-inhibiittoreita. IFNγ-välitteinen tryptofaanipuute yleisesti lisää klamydiaalisten geenien transkriptiota, mutta vähentää translaatiota. Toisin kuin ajateltiin, tryptofaanirikkaiden geenien transkription on huomattu nousevan tryptofaanivarastojen vähentyessä.

IFN $\gamma$ -välitteisten reaktioiden oletetaan olevan isäntälajispesifisiä (Ouellette ym. 2016). Tätä on tutkittu muun muassa *Chlamydia muridarum* -bakteerin IFN $\gamma$ -välitteisillä reaktioilla. Hiiren IFN $\gamma$  ei vaikuta IDO-ekspressioon *in vitro* (Roschik ym. 2006), joten hiirisolujen tryptofaanivarastojen oletetaan pysyvän muuttumattomina IFN $\gamma$ -lisäyksen myötä (Ouellette ym. 2016). Tämän oletettiin olevan syynä siihen, että *C. muridarum* -bakteerin genomi ei sisällä geenejä, jotka vastaavat tryptofaanivarastojen vähentymisestä johtuvaan aminohappopuutteeseen. Myöhemmin on kuitenkin todettu, että *C. muridarum* -infektiot laukaisevat IDO1–2-välitteisen tryptofaanin muuttumisen kynureniiniksi *in vivo* hiiren keuhkoepiteelissä (Virok ym. 2019). Tämä vastaa ihmisen IFN $\gamma$ -välitteistä reaktiota *Chlamydia*-suvun bakteerin infekioon, mutta hiirellä IDO:n aktivoituminen tapahtuu siis toden näköisesti muuta signalointireittiä pitkin.

Myös infektiopaikka vaikuttaa tiettyjen geenien ilmenemiseen *Chlamydia*-suvun bakteereilla (Caldwell ym. 2003; Ouellette ym. 2016). *C. trachomatis* -bakteerin on todettu karsineen lähes kaikki tryptofaanin biosynteesistä vastaavat geenit, mutta kyseisellä bakteerilla on operoni, joka vastaa tryptofaanin tuotannosta indolista. Tätä geeniä nimitetään *trpBA*-geeniksi. Tätä geeniä ilmentävät naisten sukupuolielinten alueelta eristetyt – niin silmiä, kuin sukupuolielimiäkin infektoivat kannat – mutta silmästä eristetyt kannat eivät (Caldwell ym. 2003). Tämän epäillään johtuvan siitä, että bakteeri saa indolia naisten sukupuolielinten alueilla elävältä mikrobiflooralta. *C. pneumoniae* -bakteerilla ei puolestaan ole kyseistä geeniä, joka viittaa siihen, että hengitysteissä on epätodennäköisemmin indolia saatavilla (Ouellette ym. 2016). Siksi ehkä *C. pneumoniae* on myös herkempi laukaisemaan IFN $\gamma$ -välitteisen persistenssivasteen, kuin *C. trachomatis*.

### 3 *CHLAMYDIA PNEUMONIAE*

*Chlamydia pneumoniae* herätti suurta keskustelua 1990–2000-luvuilla, kun pyrittiin selvittämään, onko kyseinen bakteeri mahdollisesti yhdistettävissä yleisiin kehittyneiden maiden kansansairauksiin, kuten ateroskleroosiin ja Alzheimerin tautiin, sekä onko sillä yhteyksiä muihinkin sairauksiin (Hanski ja Vuorela, 2014). 2000-luvun tutkimuksissa kuitenkin todettiin, etteivät antibiootit toimisi ennaltaehkäisevänä lääkityksenä ainakaan ateroskleroosista syntyviä komplikaatioita vastaan, joka puolestaan herätti epäilystä bakteerin liittymättömyydestä tautiin. Myöhemmin *C. pneumoniae* -bakteereilla todettiin persistenssiä ja todettiin, että antibiooteilla, joita tutkittiin ennaltaehkäisevänä lääkityksenä, ei pystytä hävittämään infektoita täysin, vaan ne indusoivat tätä persistenssiä.

#### 3.1 *Chlamydia pneumoniae* -bakteerin historiaa

Vaikkei kyseessä olekaan pääasiallinen infektiokohde, itseasiassa ensimmäinen isolaatti saatiin silmän sidekalvokudoksesta 1960-luvulla ja vasta vuonna 1983 *C. pneumoniae* -infektio löydettiin ensimmäisen kerran hengitysteistä (Burillo ja Bouza 2010). Näiden ensimmäisten isolaattien uskottiin olevan uusi *C. psittaci* -kanta, mutta kuitenkin huomattiin eroavaisuuksia tähän ja *C. trachomatis* -kantoihin. Uuden löydetyn kannan EB:t poikkesit morfologisesti pyöreistä *C. trachomatis* ja *C. psittaci* -bakteereista, ollen päärynän muotoisia, sekä uuden kannan EB:itä ympäröi periplasminen tila. Jälkeenpäin huomattiin, että eri kannoilla voi olla eri muotoisia EB:itä, niin päärynän muotoisia kuin pyöreitäkin (Miyashita ym. 1993). DNA-homologiatestit osoittivat, että löydetty bakteerikanta erosi huomattavasti *C. trachomatis* ja *C. psittaci* -kannoista, kun taas bakteereilla keskenään oli yli 95 % samanlaisuus (Burillo ja Bouza 2010). Ruskuaissiviljelmät olivat ennen ainoa keino viljellä *Chlamydia*-sukuvun bakteereita, joten myös ensimmäiset *C. pneumoniae* -isolaatit kasvatettiin ruskuaissiviljelmissä, kunnes kehitettiin uudempia soluviljelmämenetelmiä elättää kyseisiä bakteereja.



### 3.2 *Chlamydia pneumoniae* -infektiot

*Chlamydia pneumoniae* -infektio saadaan pisaratartuntana hengitystie-eritteistä yleensä ilmateitse ja bakteerin aiheuttamaa infektiota voidaan kutsua kansankielisesti keuhkoklamydiaksi (Burillo ja Bouza 2010; Keuhkoklamydia (online) 2015). Infektiot ilmenevät yleensä ympäri maailmaa muutaman kuukauden mittaisina epidemioina (Keuhkoklamydia (online) 2015). Infektiot ovat yleisiä ja laajasti levinneitä niin kehittyviin, kuin kehittyneisiinkin maihin. Bakteerilajin sisäinen geno- ja fenotyypinen vaihtelu on hyvin vähäistä (Burillo ja Bouza 2010). Primääri-infektioita todetaan lähinnä kouluikäisillä lapsilla ja nuorilla aikuisilla, kun taas jälleeninfektioita on aikuisiällä (Burillo ja Bouza 2010; Keuhkoklamydia (online) 2015). Serologisia todisteita aiemmasta infektiosta voidaan todeta noin 50 % nuorista aikuisista ja jopa 75 % vanhemmalla väestöllä (Burillo ja Bouza 2010). Kyseessä on merkittävä ylä- ja alahengitystietulehduksia aiheuttava patogeeni, jonka pääasialliset aiheuttamat tulehdukset ovat keuhkokuume ja keuhkoputkentulehdus. Bakteeri saattaa kuitenkin myös aiheuttaa poskiontelotulehduksia, nielutulehduksia ja kurkunpääntulehduksia ainoina oireina tai yhteydessä alahengitystietulehduksen kanssa.

Infektion saamisesta kuluu yleensä noin 21 päivää ensioireiden ilmaantumiseen (Burillo ja Bouza 2010). Kyseessä on siis pidempi aika, kuin monilla muilla hengitystietulehduksia aiheuttavilla patogeeneilla. Infektiot ovat yleensä vähäoireisia tai jopa oireettomia. Oireellisissa infektioissa oireet ovat yleensä epäspesifejä ja muistuttavat muita epätyypillisten organismien, kuten *Mycoplasma pneumoniae* -bakteerin tai hengitystieviruksen aiheuttaman tulehduksen oireita (Cunha 2006). Erona *M. pneumoniae* -infektioon on kurkunpääntulehdus, joka ei ole aina, mutta yleensä osa *C. pneumoniae* -infektioita. Muita oireita voivat olla nuha, kurkkukipu tai äänen karheus. Yleensä infektiot alkavat kuumeilulla, jonka lisäksi voi olla myös lihaskipuja ja vilunväristyksiä, joiden jälkeen alkaa yskä, joka on vallitsevin oire infektioissa (Burillo ja Bouza 2010). Tämä kaksivaiheinen taudin kehittyminen saattaa olla syynä yleensä viivästyneeseen hoitoon hakeutumiseen ja vaikeuttaa varsinaisen taudin alkuajankohdan määrittämistä. Taudin alettua hengitystietulehdus saattaa jatkua pitkäänkin, yskä ja heikkovointisuus saattavat jatkua viikoista kuukausiin antibiootihoidosta riippumatta. Infektio saattaa

laukaista astman tai heikentää astman hoitotasapainoa, sillä  $T_H2$ -välitteinen hengitysteiden inflammatorinen vaste nousee. Vakavia keuhkokuumeita ilmenee henkilöillä, joiden hengitystietöiminta on huomattavasti heikentynyt, ja infektiot heikentävät ennestään vaarantunutta terveydentilaa esim. kystista fibroosia sairastavilla henkilöillä (Emre ym. 1996). Leukemiaa sairastavilla ja (hoidollisista syistä) neutropeenilla henkilöillä infektio voi olla hengenvaarallinen (Heinimann ym. 2000). Sairaalahoidossa olevien potilaiden infektiosta on vähemmän tietoa ja keuhkokuume tutkimuksissa usein jätetään *C. pneumoniae* -infektiot mainitsematta, vaikka arviolta 10 % johtuu kyseisestä taudinaiheuttajasta (Burillo ja Bouza 2010).

### 3.3 Keuhkokuume diagnostiikka ja *Chlamydia pneumoniae* -infektion toteaminen

Keuhkokuume tapauksissa radiologisten tutkimusten löydös on yleensä yksittäinen, segmentoitunut, laikukas infiltraatti, joka muistuttaa muiden epätyypillisten taudinaiheuttajien (kuten *Streptococcus pneumoniae*) löydöstä (Burillo ja Bouza 2010). *Chlamydia pneumoniae* -infektion aikana valkosolutasot eivät yleensä nouse, joka on tyypillistä muillekin epätyypillisille keuhkokuumeen aiheuttajille. Tästä syystä edellä mainitut eivät ole luotettavia diagnostisia keinoja yksilöimään keuhkokuumeen aiheuttajaa. Nykysäityksen mukaan oireettomat keuhkokuumeinfektiot ovat harvinaisia, joten diagnostisena keinona voidaan käyttää bakteerin eristämistä oireelliselta potilaalta. Infektioiden identifioimiseksi käytetään soluviljelmiä, jotka tehdään laboratoriopropagoiduilla solulinjoilla. Näyte otetaan nenänielusta pyyhkäisy näytteenä.

Yleisimmin käytetyt serologiset menetelmät ovat komplementin aktivaatioon perustuva määrittäminen, mikroimmunofluoresenssimäärittäminen (MIF-määrittäminen), ja entsyymi-immunomäärittäykset immunoglobuliineille M, A ja G (IgM, IgA ja IgG), sekä heimo-, laji- tai serotyyppispesifiset vasta-ainemäärittäykset (Wang 2000). Komplementin aktivaatioon perustuva määrittäminen on todettu epätarkaksi. Sen on huomattu määrittävän kaikkia *Chlamydia*-suvun infektoita, eikä vain spesifisti *C. pneumoniae* -infektoita. Akuuteissa infektoissa on suositeltu MIF-määrittäystä, jolla saadaan 50–90 % herkkyys kahden eri aikapisteessä otetun seeruminäytteen välillä (Burillo ja Bouza 2010). Määrittämisessä käytetään formalinisoituja EB:itä *C. trachomatis*, *C. psittaci* ja *C. pneumo-*

*niae* -kannoista tai serovaareista (Wang 2000). MIF-määritys on kuitenkin vaativa, aikaa vievä ja soveltuu heikosti suuremmalle otosmäärälle, sekä tulosten tulkinta voi myös subjektiivisesti vaihdella laboratoriokohtaisesti, joten se vaatii perehtyneen ja koulutetun henkilökunnan (Burillo ja Bouza 2010). Muutamia kaupallisia *C. pneumoniae* -määritykseen suunniteltuja MIF-kittejä on olemassa.

Suomessa nykyään suositellaan ja diagnostiikka onkin keskittynyt ensisijaisesti vastainemäärityksiin, mutta epäselvissä tapauksissa voidaan hyödyntää PCR-diagnostiikkaa (Duodecim – Lääkärin käsikirja (Keuhkokuume) 2020). Immunologiset määritykset vaativat kaksi eri aikapisteessä otettua seeruminäytettä, joiden välillä tiitterin on noustava vähintään nelinkertaiseksi ja yksittäisessä seeruminäytteessä IgM yli 1:16, ja/tai IgG yli 1:512 (Burillo ja Bouza 2010). IgM nousee vasta 2–3 viikkoa oireiden alkamisen jälkeen, eikä siis sovellu alkuvaiheen taudin määrittämiseen. Taudilta suojaavaa immuniteettia ei myöskään muodostu ja jälleeninfektiot ovat yleisiä. Jälleeninfektiot ovat aikuisiällä yleisempiä, kuin primääri-infektiot. IgM-tasot eivät nouse jälleeninfektioissa, joten vaikka IgM-arvot antaisivatkin negatiivisen tuloksen, ei infektion mahdollisuutta voi sulkea sen takia pois. Tämän lisäksi taudin sairastaneilla saattaa olla positiivisen tuloksen antava määrä IgG:tä vielä useamman vuoden taudin sairastamisen jälkeen ja IgG-tasot välillä 1:16–512 viittavatkin aiempaan infektiin. IgA-määrityksillä ei olla huomattu olevan diagnostista relevanssia.

PCR- ja PCR-immunomääritykset ovat antaneet lupaavia tuloksia taudin määrityksessä, mutta täysin standardoitua menetelmää ei vielä ole (Burillo ja Bouza 2010). Standardoinnin voisi tehdä PstI-fragmentin, ompA-geenin tai 16S rRNA-geenin suhteen ja näitä suositellaankin käytettävän määritysten mitattavina parametreinä. Muun muassa Burillo ja Bouza (2010) kirjoittavat, että artikkelin julkaisuhetkellä *Chlamydia pneumoniae* -bakteerien PCR-diagnostiikkaan suunniteltuja kittejä ei ollut markkinoilla, mutta tällä hetkellä on saatavilla esimerkiksi bakteerin ompA-geenin määritykseen perustuva *GeneProof Chlamydia pneumoniae PCR Kit* (GeneProof, 2020). PCR-määritystä onkin käytetty enemmän tutkimuskäytössä, kuin diagnostisena työkaluna (Burillo ja Bouza 2010). PCR-diagnostiikka vaikuttaisi havaitsevan aktiivisen infektion herkemmin kuin

MIF, mutta herkkyys on heikompi, sillä PCR antaa yleensä virheellisen negatiivisen tuloksen antibioottikuurin alettua.

### 3.4 Keuhkokuumeen ja *Chlamydia pneumoniae* -infektioiden hoito

Yleensä yksi serologinen näyte ei riitä varmistamaan infektiota ja antibioottihoito aloitetaan ennen kuin varma tulos voidaan saada (Burillo ja Bouza 2010; Duodecim – Lääkärin käsikirja (Keuhkokuume) 2020). *In vitro* -kokeissa aluksi havaittiin tehoa erytromysiinillä, tetrasykliinillä ja doksisykliinillä, joita pidettiin ensisijaisina antibiootteina. Resistenssiä huomattiin penisilliinien ja sulfalääkkeiden lisäksi heti alussa oflaksasiinilla, mutta uudempien kinolonien, kuten levofloksasiinin ja moksifloksasiinin todettiin tehoavan. Aikuisille suositellut annokset olivat tetrasykliiniä 500 mg neljä kertaa vuorokaudessa 14 vuorokauden ajan, doksisykliiniä 100 mg kaksi kertaa vuorokaudessa 14 vuorokauden ajan tai erytromysiiniä 500 mg neljä kertaa vuorokaudessa 14 vuorokauden ajan. Mikäli potilas ei siedä näin korkeaa erytromysiiniannosta, saatettiin antaa 250 mg neljä kertaa vuorokaudessa 21 vuorokauden ajan. Alle 8-vuotiaille ei suositeltu tetrasykliinejä, vaan annettiin erytromysiiniä 30–50 mg/kg vuorokaudessa jaettuna neljään annokseen. Mikäli keuhkokuumeen jälkeen minkä tahansa antibioottikuurin jälkeen oli edelleen yskää ja heikkovointisuutta, annettiin toinen antibioottikuuri, suosien tetrasykliinejä.

Jälkeenpäin huomattiin, että atsitromysiini ja klaritromysiini saavuttavat suuremmat solunsisäiset ja kudospitoisuudet, kuin doksisykliini ja erytromysiini (Burillo ja Bouza 2010). Ne aiheuttavat myös huomattavasti vähemmän ruoansulatuskanavan haittoja, kuin erytromysiini. Suositeltu annos atsitromysiiniä on 500 mg ensimmäisenä ja 250 mg neljänä seuraavana päivänä kerran vuorokaudessa tai klaritromysiiniä 500 mg kaksi kertaa vuorokaudessa 10–14 vuorokauden ajan. Suomessa lapsille ei ole erillistä suositusta *C. pneumoniae* -bakteerin aiheuttaman keuhkokuumeen hoitoon (Duodecim – Lääkärin käsikirja (Lasten keuhkokuume) 2019), mutta esimerkiksi Espanjassa sairaaloissa suositellaan atsitromysiiniä 5–12 mg/kg kerran vuorokaudessa tai klaritromysiiniä 7,5 mg/kg vuorokaudessa jaettuna kahteen annokseen vastaavan pituisina kuureina (Burillo ja Bouza 2010).

Suomessa antibioottihoito aloitetaan keuhkokuumeetapauksissa aina heti (Duodecim – Lääkärin käsikirja (Keuhkokuume) 2020). Hoito aloitetaan yleensä amoksisilliinilla 750–1000 mg annoksella kolme kertaa vuorokaudessa, mutta mikäli lääkehoito ei tunnu tehoavan 2–4 vuorokaudessa, katetaan epätyypilliset keuhkokuumeen aiheuttaja lisäämällä lääkekuuriin doksisykliini tai makrolidiantibiootti. Penisilliiniallergikoille aloitetaan heti moksifloksasiini 400 mg kerran vuorokaudessa tai levofloksasiini joko 500 mg (1–)2 kertaa vuorokaudessa tai 750 mg kerran vuorokaudessa, mutta kyseiset antibiootit lisäävät resistenssin mahdollisuutta useilla bakteerilajeilla.

Yleensä antibioottikuurilla *Chlamydia pneumoniae* -infektiosta toivutaan täysin, vaikka taudit ovatkin tyypillisten keuhkokuumeen aiheuttajien aiheuttamia tauteja pidempiä (Burillo ja Bouza 2010). Vaikka positiivinen diagnoosi infektiosta on tehty, silti tutkimuksissa on kuvattu heikosti, miten antibioottikuurit ovat tehonneet aikuisilla. Lapsilla ilmenneistä infektiosta on enemmän tutkimuksia, joiden mukaan vaste on ollut 79 % klaritromysiinilla, 86 % erytromysiinilla ja 83 % atsitromysiinillä. *In vitro* -tehoavista antibioottikuureista huolimatta on siis huomattu infektion jäävän päälle *in vivo*, vaikka oireet ovat parantuneet. Tämän kaltaista persistenssiä on huomattu niin atsitromysiini-, erytromysiini-, moksifloksasiini-, tetrasykliini-, kuin doksisykliinikuurienkin jälkeen.

### 3.5 *Chlamydia pneumoniae* -infektioiden haasteet ja mahdolliset ratkaisut

*Chlamydia pneumoniae* -bakteereita ympäröivä ulkokalvo (lipopolysakkareista koostuva LPS-kalvo) vaikeuttaa antibioottien läpäisevyyttä ja pääsyä vaikutuskohteeseensa (Hanski ja Vuorela, 2014). Päästäkseen vaikuttamaan inkluusion sisällä eläviin RB-muotoisiin bakteereihin, antibioottien tulisi pystyä läpäisemään isäntäsolun solukalvo, sen jälkeen inkluusion solukalvo ja viimeiseksi bakteerin solukalvo. Olisi siis mahdollisesti helpompi löytää lääkeaine, joka vaikuttaisi rakenteisiin inkluusiokalvon ulkopuolella, esimerkiksi bakteerien proteiineihin inkluusiokalvolla tai efektoreihin, joita eritetään isäntäsolun sytoplasmaan.

Tutkimuksissa on todettu joidenkin yhdisteiden estävän *C. pneumoniae* -bakteerin toimintaa (Hanski ja Vuorela, 2014). Muun muassa serivastatiini näyttäisi vähentävän koh-

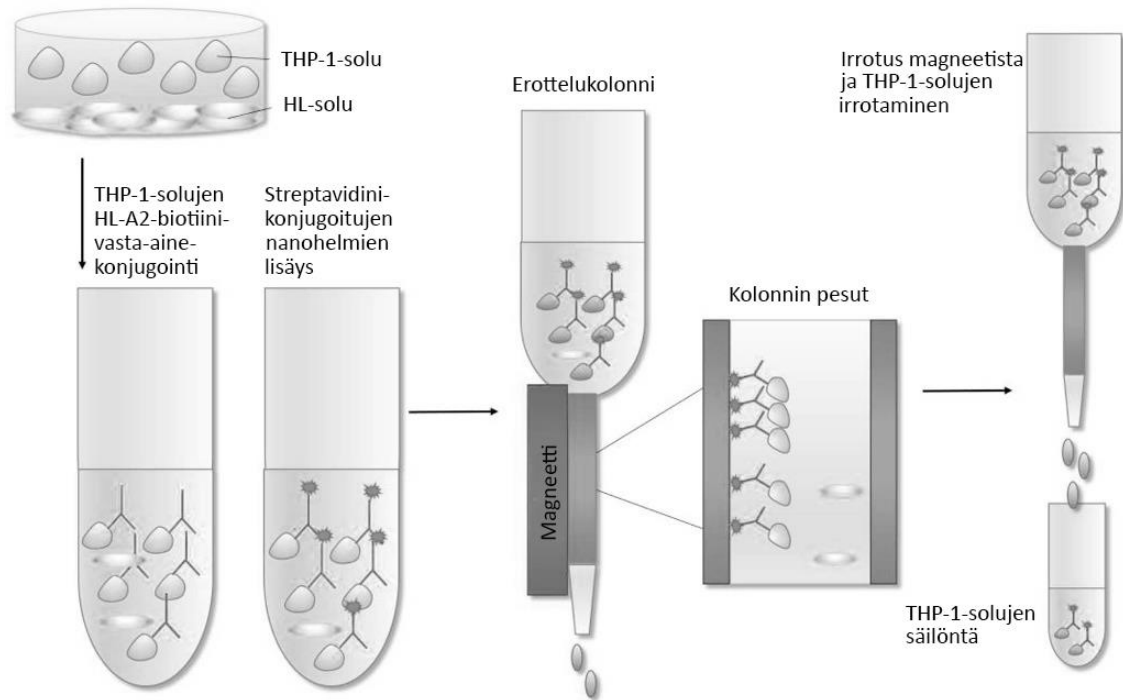
talaisesti infektiivisyyttä makrofaageissa, sekä  $\beta^{2,2}$ -aminohappojohdannaiset ovat toimineet antimikrobisten peptidien tavoin. Haasteena  $\beta^{2,2}$ -aminohappojohdannaisten kohdalla on muun muassa niiden annostelu, sillä todennäköisesti nämä yhdisteet hajoaisivat ruoansulatuskanavassa ja ne tulisi annostella injektioina. Olisikin siis toivottavaa löytää mahdollisia pienmolekyylilääkeaineita, joilla olisi *Chlamydia*-suvun bakteerien infektiivisyyttä inhiboiva vaikutus.

Ongelmaksi *C. pneumoniae* -infektioiden hoidossa on osoittautunut myös bakteerin taipumus muuttua persistenttiin muotoon päästessään infektoimaan monosyyttejä (Airanne ym. 1999). Tämän persistenttiin muotoon muuttumisen havaittiin olevan täysin riippumaton muista ärsykkeistä ja se tapahtuu täysin spontaanisti. *C. pneumoniae* -bakteerit myös säätelevät monosyyttien ohjattua solukuolemaa, pitäen isäntäsolunsa hengissä jopa 120 tuntia (Airanne ym. 2002). Näin ollen valkosoluja infektoimaan edenneen infektion hoitoon tarvittaisiin persistenttiin bakteerimuotoon tehoava, uusi lääkeaine, tai infektiot tulisi tunnistaa jo primääri-infektiopaikalta keuhkoista ja kehittää lääkeaine, joka estää infektion etenemistä valkosoluihin.

#### 4 TAVOITTEET

Ymmärtääksemme *Chlamydia pneumoniae* -infektion kulkua keuhkoepiteelistä valkosoluihin, sekä ymmärtääksemme tämän siirtymän mekanismeja ja löytääksemme mahdollisia vaikutuskohtia sen estämiseksi, täytyisi luoda yhteissoluviljelmämalli näille solutyypeille. Ongelmaksi on koitunut aiemmin, miten nämä kyseiset solutyypit saadaan eroteltua toisistaan, että jäljelle jää mahdollisimman puhdas saanto pelkkiä THP-1-soluja. Kortesoja ym. (2020) kertoo, että aiempia tutkimuksia ja yhteissoluviljelmämallia on luotu lähinnä käsittelemään infektion siirtymistä valkosoluista verisuoniepiteeli-soluihin. Puolestaan tutkimukset, joissa on luotu keuhkoepiteeli-valkosoluyhteissoluviljelmä, on keskitytty sytokiinien tai muiden immunologisten vasta-ten *C. pneumoniae* -infektiota kohtaan tutkimiseen.

Kortesoja ym. (2020) esitteleekin uuden mahdollisen tavan eritellä keuhkoepiteeli- ja valkosolut toisistaan hyödyntäen nanohelmikonjugointia ja *MACS separation system* -kolonneja ja -magneettierottelijaa (kuva 4). Tässä erottelumallissa THP-1-solut konjugoidaan HLA-A2-biotiini (HLA-A2 = humaanin leukosyyttivasta-aine A2, *human leukocyte antigen* A2) välitteisesti streptavidini-nanohelmi-kompleksiin ja nämä HLA-A2-biotiini-streptavidini-nanohelmikonjugoidut THP-1-solut voidaan erotella HL-soluista magneettisesti. Tässä pro gradu -työssä pyrittiin hyödyntämään tuota tekniikkaa ja löytämään positiivinen kontrolliyhdiste *C. pneumoniae* -bakteerin HL-soluista THP-1-soluihin kulkua estämään kyseisessä protokollassa. Malliyhdisteiksi valittiin kirjallisuudessa aiemmin *C. pneumoniae* -bakteerin HL-soluihin internalisoitumista estäneitä yhdisteitä (mm. schisandriini), kyseisen bakteerin THP-1-soluista vasoendoteeliin kulkeutumista estäneitä yhdisteitä (atorvastatiini), sekä muita yhdisteitä vastaavan tyylisistä ryhmistä. Tarkoituksena oli myös tutkia mihin infektion vaiheeseen mahdollinen löytyvä kontrolliyhdiste vaikuttaa yhteissoluviljelmässä: *C. pneumoniae* -bakteerin HL-soluihin internalisaatioon, HL-soluista vapautumiseen, THP-1-soluihin internalisaatioon vai bakteerin jälleeninfektiokykyyn.



Kuva 4. THP-1-solujen erottelu HL-soluista käyttäen *MACS separation system* -erottelukittiä. (Mukaiillen Kortesoja ym. 2020)

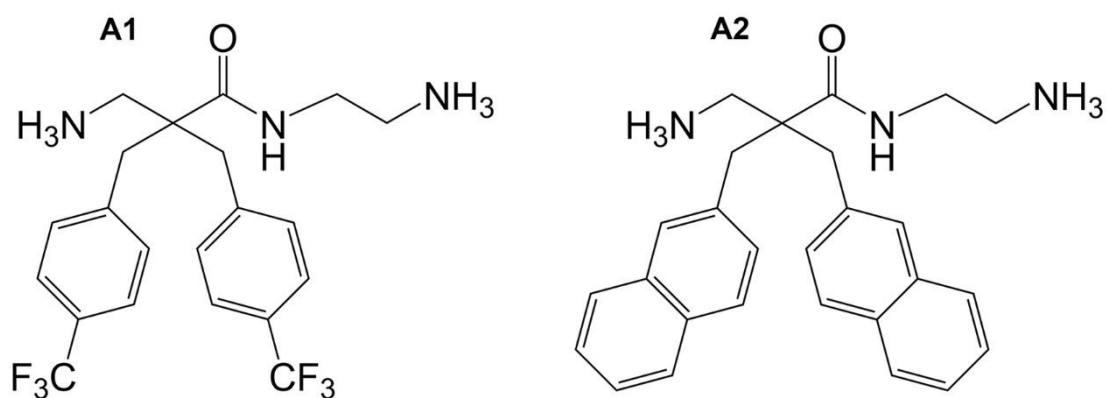


## 5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Alla olevissa kappaleissa esitellään tutkimuksissa käytetyt materiaalit ja itse tutkimusten protokollat. Niin valitut tutkittavat aineet, kuin valitut protokollatkin perustuvat aiempaan kirjallisuuteen ja niiden tuloksiin.

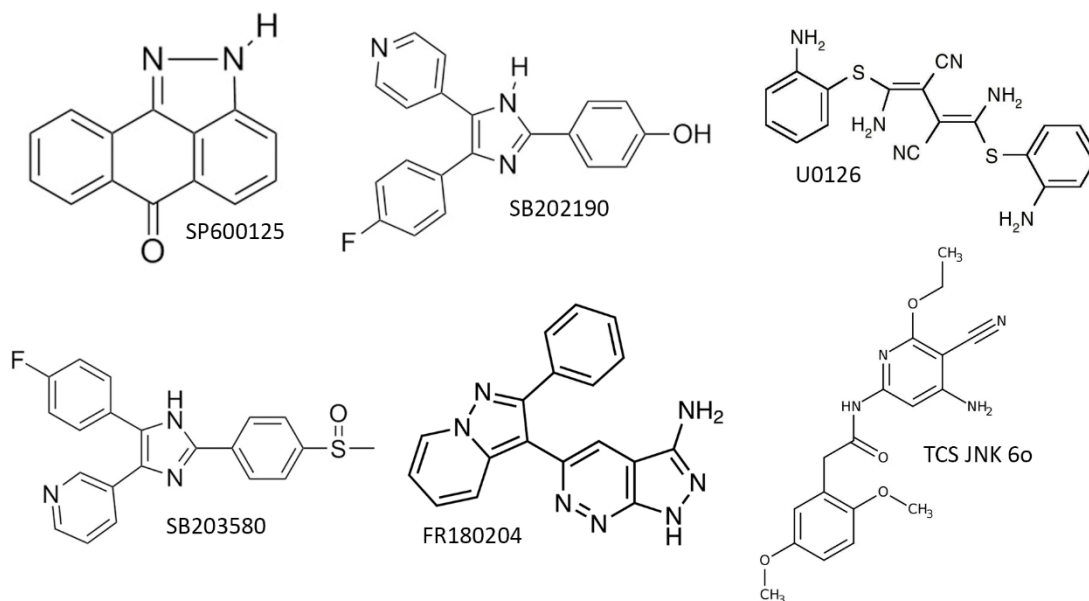
### 5.1 Tutkimuksissa käytetyt yhdisteet

Tutkimuksissa käytettiin  $\beta^{2,2}$ -aminohappojohdannaisia A1 ja A2 (kuva 5) (The Arctic University of Norway, Tromssa, Norja) (Hanski ym. 2016). Kantaliuoksen konsentraatio oli 5 mM ja tutkimuksissa käytettiin 5  $\mu$ M konsentraatiota. Yhdisteet ovat antimikrobisten peptidien lailla toimivia yhdisteitä.



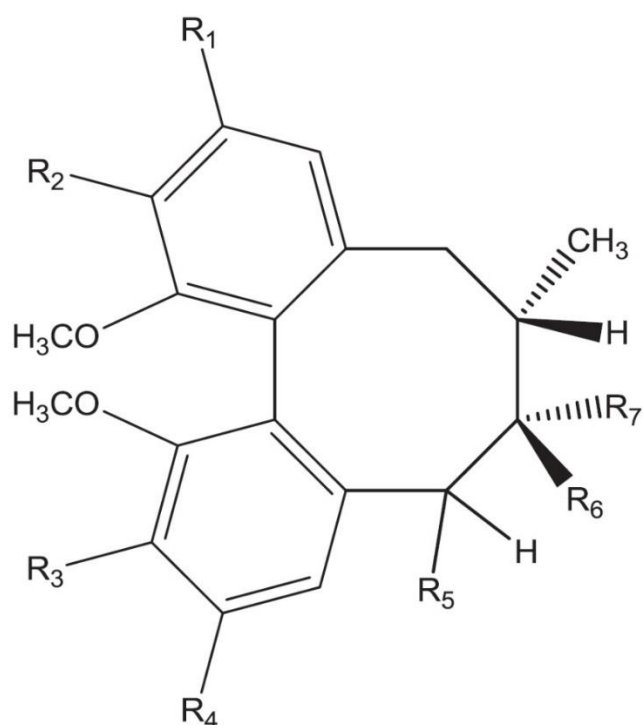
Kuva 5.  $\beta^{2,2}$ -aminohappojohdannaiset A1 ja A2.

Mitogeneeni-aktivoituvat proteiinikinaasi-inhibiittorit (MAPK-inhibiittorit) (Tocris Bioscience, Bristol, Yhdistyneet kuningaskunnat) ovat yleisiä probeja, joita käytetään tutkimuksissa. Kantaliuoksen konsentraatio 20 mM ja tutkimuksissa käytettävä konsentraatio oli 10  $\mu$ M. SP600125 on JNK-, SB202190 on p38-, U0126 on MEK1/2-, SB203580 on MAPKAP-kinaasi-2-, FR180204 on ERK1- sekä ERK2-, ja TCS JNK 6o on JNK-inhibiittori. Tutkimuksessa käytettyjen MAPK-inhibiittorien rakennekaavat on esitetty kuvassa 6.



Kuva 6. Tutkimuksissa käytetyt MAPK-inhibiittorit.

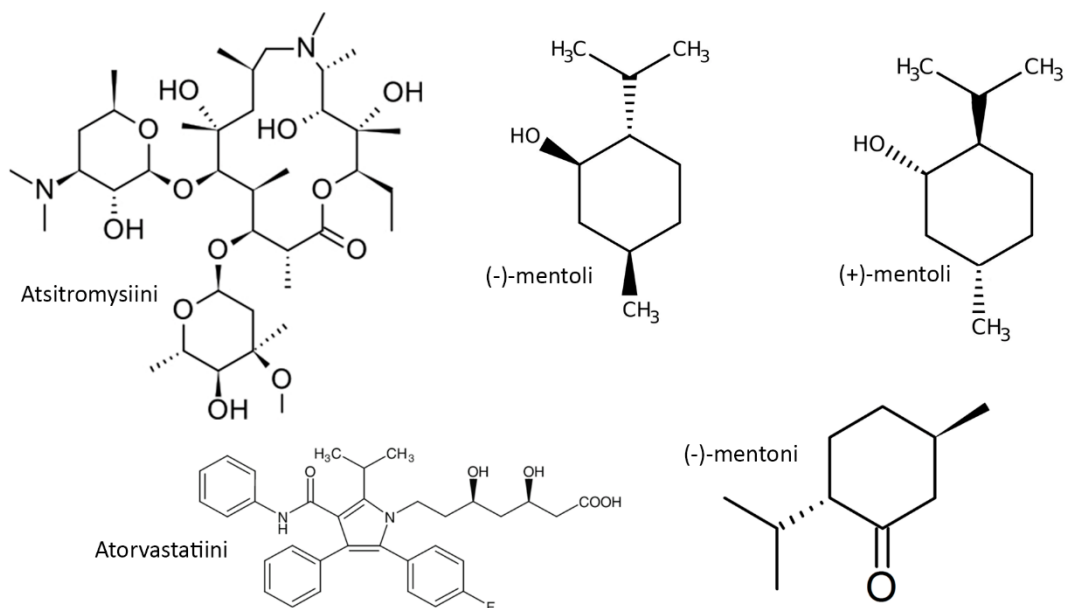
Schisandriini (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), schisandriini B ja schisandriini C (Fine Tech Industries, Lontoo, Yhdistyneet kuningaskunnat) ovat *Schisandra chinensis* -kasvista eristettyjä lignaaneja, joilla on dibentsosyklo-oktadieenirakenne (kuva 7). Kantaliuoksen konsentraatio 20 mM ja tutkimuksissa käytettiin 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M ja 50  $\mu$ M konsentraatioita.



Lignaanin nimi	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
Schisandriini	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OH	CH <sub>3</sub>
Schisandriini B	-O-CH <sub>2</sub> -O		OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
Schisandriini C	-O-CH <sub>2</sub> -O		-O-CH <sub>2</sub> -O		H	H	CH <sub>3</sub>

Kuva 7. Tutkimuksissa käytettyjen schisandriinien rakennekaavat. Eri schisandriineissa olleet sivuketjut (R<sub>1</sub>–R<sub>7</sub>) ovat esitetty kuvan alalaidan taulukossa.

Tutkimuksissa käytettiin myös ensisijaiseksi antiklamydiaaliseksi antibiootiksi suositeltua atsitromysiinia, sekä 3-hydroksi-3-metyyloglutaryylikoentsyymi-A-reduktaasi (HMG-CoA-reduktaasi) atorvastatiinia, sekä (-)-mentoni- (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Saksa), (-)- ja (+)-mentolihdisteitä (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Saksa). Yhdisteiden rakennekaavat on esitetty kuvassa 8. Kaikissa tutkimuksissa atsitromysiinin pitoisuus oli 20 nM, atorvastatiinin 10 tai 20 nM, sekä mentoli- ja mentolihdisteiden pitoisuus 1 mg/ml. Kaikkien tutkimuksissa käytettävien yhdisteiden kantaliuokset olivat tehty dimetyylisulfoksidiin (DMSO:in).



Kuva 8. Tutkimuksissa käytettyjen yhdisteiden rakennekaavoja.

## 5.2 Käytetyt solulinjat

Töissä käytettiin kahta solulinjaa; HL-keuhkoepiteelisoluja ja erilaistumattomia THP-1-monosyyttejä. HL-solulinja oli saatu Pekka Saikulta Oulun yliopistosta ja THP-1-solulinja oli hankittu American Type Culture Collection (ATCC) -yhteisöltä. HL-solumedium on tehty RPMI 1640 -elatusliuokseen (BioWhittaker, Lonza, Basel, Sveitsi), jossa on 7,5 % FBS:a (*fetal bovine serum*) (BioWhittaker), 2 mM L-glutamiinia (BioWhittaker), sekä 20 mg/ml gentamysiinia (Fluka Buchs, Sveitsi). THP-1-solumedium koostuu puolestaan RPMI 1640 -elatusliuoksesta (Hollantilainen versio) (Gibco, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Paisley, Yhdistyneet kuningaskunnat), jossa on 10 % FBS:a (BioWhittaker), 2 mM L-glutamiinia (BioWhittaker), sekä 20 mg/ml gentamysiinia (Fluka Buchs, Sveitsi), ja 0,05 mM merkaptoetanolia (Gibco). Soluja elätettiin 37 °C, 5 % V/V CO<sub>2</sub> ja 95 % suhteellisessa ilmakehässä.

## 5.3 *Chlamydia pneumoniae* -kanta

Töissä käytettiin *Chlamydia pneumoniae* -bakteerin CV6, eli kardiovaskulaari-isolaattikantaa, joka oli saatu Itävallasta, Salzburgin yliopistosta professori Matthias

Maassilta. Bakteerit propagoitiin HL-solulinjassa, ja propagoinnissa elatusliuoksena käytettiin edellä kuvailtua HL-elatusliuosta, johon oli lisätty 0,6 µg/ml sykloheksimidia, 100 µg/ml streptomysiinia, sekä 3,75 µg amfoterisiini B:tä. 72 tunnin inkubaation jälkeen HL-solut lyysattiin, ja sentrifugoitiin 10 minuuttia 500 g 4 °C:ssa poistaen solujätteen. Bakteerin EB-muodot pelletöitiin sentrifugoimalla tunnin ajan 21 000 g 4 °C:ssa ja ne resuspensoitiin sukroosi-fosfaatti-glutamiinihappoon -80 °C:een. Jokaisen propagoinnin yhteydessä määritettiin kyseisessä propagoinnissa saadun inkluusioita tuottavien yksiköiden määrä (IFU, *inclusion forming unit*) infektoimalla HL-soluja peiteliuoskoilla 10-kertaisin laimennoksien ja laskemalla muodostuneet inkluusiot 72 tunnin jälkeen. Kokeen mukaan infektiioon käytettiin MOI1 (multiplicity of infection) tai MOI2.

#### 5.4 HL-solujen infektointi

HL-soluja infektoitiin HL-THP-1-yhteissoluviljelmiä, sekä yhdisteillä esikäsiteltyjen bakteerien infekti- ja internalisaatiokokeita varten. HL-solut jaettiin 24-kuoppalevyille infektiota edeltävänä päivänä kokeen mukaan 300 000 tai 400 000 kappaletta yhtä kuoppaa kohti. Vanha elatusliuos poistettiin ja solut infektoitiin 200 µl infektioliuosta, joka koostui 1 % CHX-HL-elatusliuoksesta (sykloheksimidi-HL-elatusliuos) ja tietyistä määristä *C. pneumoniae* -bakteereita MOI-arvon mukaan. Infektioliuoksen lisäyksen jälkeen kuoppalevyjä sentrifugoitiin 550 g yhden tunnin ajan, jonka jälkeen ne siirrettiin yhdeksi tunniksi 37 °C ja 5 % CO<sub>2</sub>-pitoisuuteen elatuskaappiin. Tämän jälkeen infektioliuos poistettiin ja soluille laitettiin 1 ml 1 % CHX-HL-mediumia sellaisenaan (kontrollit), tai sisältäen tutkittavat yhdisteet aiemmin ilmoitetuissa konsentraatioissa. HL-solujen annettiin inkuboitua vielä 67–72 tuntia ennen jatkotutkimuksia.

#### 5.5 Immunofluoresenssivärjäys

HL-soluja infektoineiden *C. pneumoniae*-bakteerien määrää solujen sisällä tutkittiin infektoimalla HL-solut ja värjäämällä solujen sisällä olevat bakteeri-inkluusiot Bio-Rad Pathfinder® Chlamydia Culture Confirmation System Monoclonal Antibody -vastaaineliuksella fluoresoiviksi. 24-kuoppalevyille laitettiin jokaiseen kuoppaan 13 mm

halkaisijaltaan oleva peitinlasi ja kuoppiin laitettiin 400 000 HL-solua kuoppaa kohti. Solut infektoitiin MOI1 ja inkuboitiin 72 tuntia 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> -pitoisuudessa. Inkubaation jälkeen HL-solut huuhdeltiin kerran 1 ml PBS-liuosta ja kiinnitettiin kiinni lasilevyihin inkuboimalla 15 minuutin ajan 1 ml metanolissa huoneenlämmössä. Tämän jälkeen lasilevyjen annettiin kuivua ja ne värjättiin Bio-Rad Pathfinder® -vastaaineliuksella 30 minuutin ajan värjäyskammiossa. Värjäyksen jälkeen lasilevyt huuhdeltiin kahdesti PBS-liuksella ja kerran vedellä ja niiden annettiin jälleen kuivua. Kuivuttuaan, lasilevyt kiinnitettiin mikroskopointilaseille Bio-Rad Pathfinder® Mounting Media -liuksella. HL-solujen sisällä olevat *C. pneumoniae* -inklusiot laskettiin neljäs-tä näkökentästä 20-kertaisella suurennoksella mikroskopoimalla Thermo Fisher Scientificin EVOS® FL Cell Imaging System -mikroskoopilla hyödyntäen GFP (Green Fluorescent Protein) -kanavaa.

## 5.6 HL-THP-1-yhteissoluviljelmä

HL-THP-1-yhteissoluviljelmän tutkimiseksi 24-kuoppalevyltä infektoitiin MOI1 4–6 kuoppaa kerralla, joissa oli 300 000 HL-solua per kuoppa, aiemmin kuvatun infektioprotokollan mukaan. Infektoinnin jälkeen solujen annettiin inkuboitua 67 tuntia, jolloin kuoppiin lisättiin 300 000 THP-1-solua kaikkiin ja tutkittavat yhdisteet 2–4 kuoppaan jättäen 2 kuoppaa kontrolleiksi. THP-1-solulisäys tehtiin THP-1-mediumissa ja solujen annettiin olla yhteisviljelmässä 5 tuntia, jonka jälkeen ne kerättiin erillisiin 1,5 ml Eppendorf-putkiin pipetoimalla.

Keräyksen jälkeen THP-1-solut vasta-ainekonjugoitiin pelletöimällä ne 1500 rpm (kierrosta minuutissa) 5 minuutin ajan sentrifuugissa. Vasta-ainekonjugointia ja solujen erottelua varten oli valmistettu 25 ml puskuriliuosta (5 mM EDTA-, 1 % BSA-PBS-liuosta) yhtä infektoitua kuoppaa kohti, ja pelletöidyt solut suspensoitiin 100 µl tätä liuosta. THP-1-solut vasta-ainekonjugoitiin pipetoimalla 1 µl BioLegend Biotin anti-human HLA-A2 -biotiiniin konjugoitua HLA-A2-vasta-ainetta (klooni BB7.2, varastoliuoksen pitoisuus 0,5 mg/ml) solususpensioon ja sitä inkuboitiin jäällä 30 minuuttia. Tämän jälkeen soluille pipetoitiin 1 ml puskuriliuosta ja solut pelletöitiin 300 g 5 minuutin ajan sentrifuugissa. Solut suspensoitiin taas 100 µl puskuria, johon pipetoitiin 1 µl BioLe-

gend MojoSort™ Streptavidin Nanobeads -streptavidiini konjugoituja nanobeadeja. Solususpensiota inkuboitin 30 minuuttia jäällä, huuhdeltiin 1 ml puskuria, pelletöitiin 300 g 5 minuutin ajan sentrifugoimalla ja suspensoitiin 500 µl puskuria.

Vasta-aine-biotiini-streptavidiini-nanobead-konjugoinnin jälkeen HL- ja THP-1-solut eroteltiin toisistaan Miltenyi Biotecin MACS® Cell Separator -erottelukittä hyödyntäen. Kitti koostui MACS® Multi Stand -alustasta, MidiMACS™ -magneettisesta erottelijasta ja MACS® LS-kolonnista. Solususpensio pipetoitiin erottelijassa kiinni olevaan LS-kolonnein ja huuhdeltiin neljä kertaa 3 ml puskuriliuosta. Tämän jälkeen kolonni erotettiin erottelijasta, asetettiin 15 ml Falcon-putken päälle, sekä tyhjennettiin lisäämällä 4 ml puskuria ja painamalla mäntää napakasti. Solut pelletöitiin 300 g 5 minuutin ajan sentrifugoimalla, suspensoitiin 1 ml puskuria ja varastoitiin -20 °C DNA:n eristämistä varten.

#### 5.7 Uusien infektiivisten bakteerisolujen muodostumista mittaava koe

400 000 HL-solua yhtä 24-kuoppalevyn kuoppaa kohti infektoitiin aiemmin kuvatus protokollan mukaisesti. 12 kuopassa oli 13 mm halkaisijan lasilevy, 12 kuoppaa oli ilman lasilevyjä. Infektion jälkeen kuoppiin lisättiin tutkittavat aineet halutuissa konsentraatioissa 1 ml 1 % CHX-HL-mediumia, sekä niiden annettiin vaikuttaa 3 tai 5 tuntia soluilla eksperimentin mukaan.

Elatusliuos poistettiin kuopista, joissa ei ollut lasilevyjä. Näihin kuoppiin pipetoitiin 220 µl uutta 1 % CHX-HL-mediumia, solut raaputettiin pipetin kärjellä irti kuoppien pohjasta ja tämä solususpensio pipetoitiin 1,5 ml Eppendorf-putkeen. Eppendorf-putkiin oli aiemmin lisätty kolme lasihelmeä, joilla solut hajotettiin vorteksoimalla. Seuraavat 12 kuoppaa, joissa oli 400 000 HL-solua ja 13 mm lasilevyt infektoitiin aiemmin kerrotun mukaisesti käyttäen infektioliuoksen sijaan 200 µl kyseistä solulysaattia ja inkuboitin 72 tuntia.

Ensimmäisten lasilevyllisten kuoppien lasilevyt käsiteltiin heti ja jälleen infektoitujen lasilevyllisten kuoppien lasilevyt kiinnitettiin metanolilla, pestiin ja käsiteltiin 72 tunnin

inkubaation jälkeen Bio-Rad Pathfinder® -vasta-aine- ja -kiinnitysliuoksilla aiemman kuvatun immunofluoresenssivärjäysprotokollan mukaisesti.

#### 5.8 *Chlamydia pneumoniae* -bakteerin esikäsittely yhdisteillä, sekä internalisaatiokokeet THP-1-soluilla

THP-1-soluja infektoitiin *C. pneumoniae* -bakteerin internalisaatio- ja esikäsiteltyjen bakteerien infektiokokeita varten. Molemmissa kokeissa 1,5 ml Eppendorf-putkeen lisättiin 100 µl THP-1-elatusliuosta sisältäen 300 000 *C. pneumoniae* -bakteeria. Bakteerien annettiin seistä jäällä kaksi tuntia joko sisältäen tutkittavat yhdisteet (esikäsitteilykoe) tai ilman yhdisteitä (internalisaatiokoe) riippuen kokeesta. THP-1-solut olivat jaettu 1–4 päivää ennen kokeita ja jos jakamisesta oli kulunut yli 3 päivää, solut sentrifugoituihin 5 minuutin ajan 300 g, vanha elatusliuos poistettiin ja lisättiin uusi THP-1-elatusliuos tilalle. Solut laskettiin Burkert-kammiolla ja niitä lisättiin 300 000 kappaletta (MOI1) yhtä Eppendorf-putkea kohti. Elatusliuosta lisättiin 1 ml asti ottaen huomioon tässä vaiheessa mahdollisen yhdisteiden lisäämisestä aiheutuvan tilavuuden kasvun (internalisaatiokoe). Tämän jälkeen THP-1-bakteeri-solususpensioita inkuboituihin kaksi tuntia 37 °C ja 5 % CO<sub>2</sub>-pitoisuudessa. THP-1-solut pelletöitiin sentrifugilla 300 g 5 minuutin ajan, supernatantti poistettiin ja solut resuspensoitiin 1 millilitraan PBS-liuosta. Solut varastoitiin -20 °C DNA:n eristämistä varten.

#### 5.9 *Chlamydia pneumoniae* -bakteerin esikäsittely yhdisteillä, sekä internalisaatiokokeet HL-soluilla

HL-soluja infektoitiin THP-1-soluja vastaavasti internalisaatio-, sekä esikäsiteltyjen bakteerien infektiokokeita varten. Kokeita varten valmistettiin 200 µl CHX-HL-mediumia, joka sisälsi 300 000 *C. pneumoniae* -bakteerisolua per tutkittava kuoppa. THP-1-soluille toteutettuja kokeita vastaavasti bakteerisuspension annettiin seistä jäällä kaksi tuntia joko sisältäen tutkittavat yhdisteet (esikäsitteilykoe) tai ilman yhdisteitä (internalisaatiokoe). 300 000 HL-solua infektoitiin jäällä inkuboiduilla bakteerisuspensioilla (MOI1) ja internalisaatiokokeissa tässä vaiheessa lisättiin tutkittavat yhdisteet. Aiemmin esitellyn HL-solujen infektioprotokollan mukaisesti HL-soluja sentrifugoituihin



tunnin ajan 550 g:ssä ja inkuboitiin sen jälkeen tunnin ajan 37 °C 5 % V/V CO<sub>2</sub> inkubaattorissa. Tämän jälkeen elatusliuos poistettiin, solut huuhdeltiin kerran 1 ml PBS-liuosta ja liuoksen poistamisen jälkeen kuoppiin lisättiin uusi millilitra PBS-liuosta. HL-solut raaputettiin kuoppien pohjalta pipetin kärjellä jälkimmäiseen PBS-liuoslisäykseen, suspensoitiin kuopassa muutaman kerran ja syntynyt solususpensio otettiin talteen 1,5 ml Eppendorf-putkiin. Eppendorf-putket varastoitiin -20 °C DNA:n eristämistä varten.

#### 5.10 DNA:n eristäminen

DNA:n eristäminen tehtiin kaupallista Thermo Fisher GeneJET Genomic DNA Purification Kit -kittiä käyttäen. Käsiteltävät solut pelletöitiin Eppendorf-putkien pohjalle 400 g:ssä 5 minuutin ajan, supernatantti poistettiin ja solut resuspensoitiin 200 µl PBS-liuosta. Solususpensioon lisättiin 200 µl Lysis solution ja proteinaasi K -liuoksia, sekä syntynyttä suspensiota inkuboitiin 56 °C 10 minuuttia välillä vorteksoiden. Tämän jälkeen lisättiin 20 µl RNAaasi A -liuosta, vorteksoiden ja suspensiota inkuboitiin huoneenlämmössä 10 minuutin ajan. Inkubaation jälkeen lisättiin 400 µl 50 % etanolia, sekä suspensoitiin pipetillä muutaman kerran. Syntynyt suspensio siirrettiin GeneJet-erotteluputkeen, jota sentrifugoitiin 6000 g minuutin ajan, jonka jälkeen kerääjäputki vaihdettiin uuteen. GeneJet-erottelijaa huuhdottiin ensin 500 µl ensimmäistä pesupuskuria ja sentrifugoitiin 8000 g 1 minuutin ajan. Sitten erottelijaa huuhdottiin 500 µl toista pesupuskuria ja sentrifugoitiin 17 000 g 3 minuutin ajan. Kerääjäputki hävitettiin, tilalle vaihdettiin 1,5 ml Eppendorf-putki ja GeneJet-erottelijaan lisättiin 200 µl eluutiopuskuria (liuotuspukuriliuosta). Liuoksen annettiin seisoa erottelijassa 2 minuutin ajan huoneenlämmössä, jonka jälkeen se sentrifugoitiin 8000 g 1 minuutin ajan. DNA:n saanto mitattiin erottelun jälkeen NanoDrop-laitteella.

#### 5.11 *Chlamydiae pneumoniae* -bakteerien määrän kvantitointi qPCR-menetelmällä

DNA:n pitoisuus määritettiin heti erottelun jälkeen NanoDrop-laitteella, mutta joissain tapauksissa se määritettiin uudestaan ennen DNA:n mittausta samalla laitteella. Jokaisesta näytteestä laskettiin 20 ng painoa vastaava tilavuus. 96-PCR-kuoppalevyille (Mic-

roAmp fast optical 96-well reaction plate with barcode, Applied biosystems by Life technologies, USA) pipetoitiin kahteen viereiseen kuoppaan (saman näytteen replikaatit) vettä niin, että DNA-liuoksen ja veden yhteistilavuus oli 9,8 µl. Tämän jälkeen lisättiin lasketut DNA-liuos tilavuudet. Seuraavaksi kuoppiin lisättiin kahta 0,4 µl OmpA-geenin aluketta - VD4R ja VD4F (Metabolan international AG, Saksa). Etualukkeen sekvenssi oli 5'-TCC GCA TTG CTC AGC C-3' ja taka-alukkeen sekvenssi oli 5'-AAA CAA TTT GCA TGA AGT CTG AGA-3'. Alukkeiden konsentraatio oli 10 µM. Lopuksi lisättiin 10 µl Master mix -liuosta (Fast sybr Green Master mix, Thermo Fisher Scientific, Liettua), joka sisälsi PCR:n muut tarvittavat osat (mm. nukleotidit sekä DNA-polymeraasin). Kaiken kaikkiaan yhden näytteen tilavuudeksi siis tuli 20 µl. 96-kuoppalevy suljettiin läpinäkyvällä, liimapintaisella kalvolla ja qPCR ajettiin fast run -ohjelmalla Applied Biosystems Step One Plus Real time PCR systems -laitteella. Ohjelma lämmitti näytteet aluksi 95 °C 20 sekunniksi, jonka jälkeen näytteet ajettiin 95 °C 3 sekunniksi ja 60 °C 30 sekunniksi 40 syklin ajaksi.

Kvantitatiivisen PCR -mittauksen (qPCR) pohjana käytettiin viisipisteistä standardisuoraa, jonka suurin bakteeripitoisuus oli  $2,6 * 10^7$  bakteeria/ml. Tästä pisteet olivat tasaisesti alenevia kymmenkertaisin välein ( $2,6 * 10^6 \rightarrow 2,6 * 10^5$  jne.). Kussakin näytteessä oleva bakteerimäärä määritettiin vertaamalla syntyneeseen standardisuoraan. Kunkin ajon yhteydessä oli myös kaksi negatiivista näytettä, joissa oli 20 µl vettä.

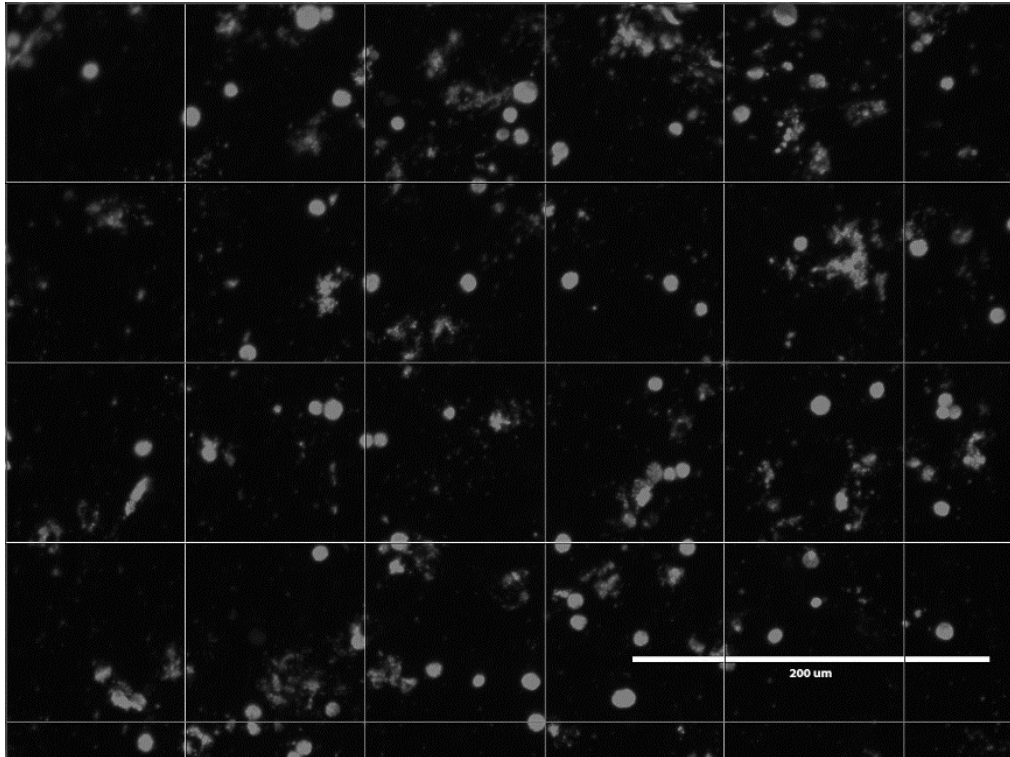
## 6 TULOKSET

Alla on esitelty kussakin tutkimuksessa saadut tulokset. Tulokset ovat pääasiassa kronologisessa järjestyksessä, sillä aiemmissa tutkimuksissa saadut tulokset ohjasivat seuraavaksi tutkittavia asioita tietyissä vaiheissa pro gradu -työtä. Kaikki tulokset ovat suhteutettu kontrolleihin ja esitetty bakteeria internalisoituneena määränä (vrt. esimerkiksi inhibiition määrä tiivistelmässä) ja hajontaviiva kuvaa keskihajontaa. Tulosten esittelystä on jätetty pois *C. pneumoniae* -bakteerin HL-soluihin internalisoitumiskokeet ja bakteerin esikäsittelykokeet THP-1-soluilla, koska kaikilla yhdisteillä näissä kokeissa bakteerin internalisoitumisaste oli noin  $100 \pm 10$  %, eli tutkimuksissa ei havaittu merkittäviä tuloksia.

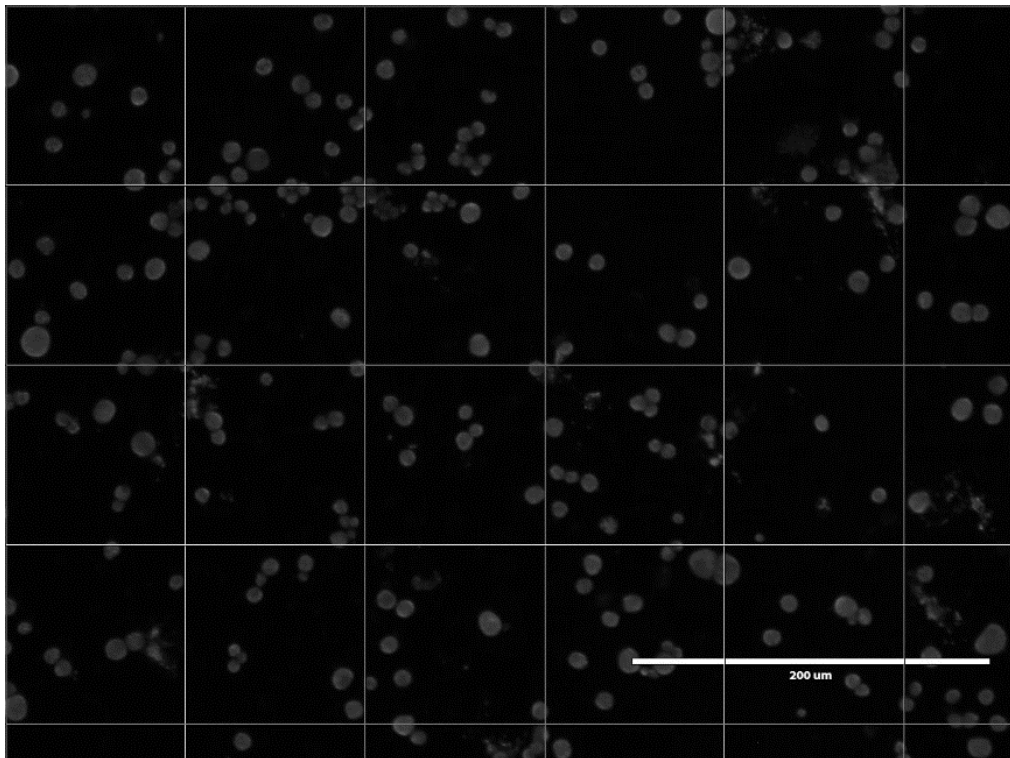
Yksittäisten tutkimusten tulokset koostuvat pääasiassa 2 biologisesta replikaatista, eli samalla protokollalla ja samoilla yhdisteillä käsitellyistä solunäytteistä. Tulosten vahvistamiseksi samoja kokeita toistettiin useampaan otteeseen biologisten replikaattien määrän kasvattamiseksi. qPCR-ajon tulokset puolestaan koostuvat aina kahdesta teknisestä replikaatista, eli samasta biologisesta replikaatista otetuista identtisistä näytteistä. Tutkimuksissa saadut, merkittävästi toisistaan poikkeavat biologisten ja teknisten replikaattien tulokset on luettu pois Gruppsin testillä, mikäli ero on todettu tilastollisesti merkittäväksi.

### 6.1 Infektion onnistumisen, sekä atsitromysiinin ja schisandriinien vaikutuksen tutkiminen immunofluoresenssivärjäyksellä

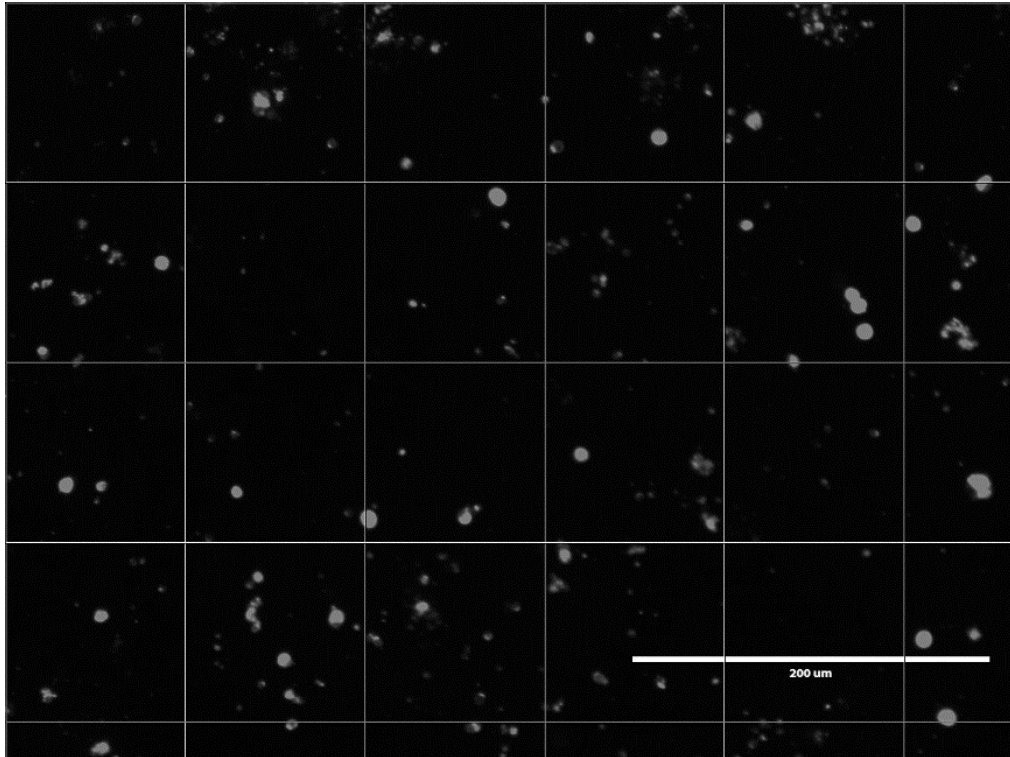
Tutkimuksen aluksi haluttiin todeta, että käyttämällä kyseistä infektiomenetelmää, HL-solut saadaan varmasti infektoitua. Tämä todettiin värjäämällä HL-solut ja niiden sisäiset inkluusiot immunofluoresenssivärjäyksellä. Samalla tutkittiin sykloheksimidin, atsitromysiinin, sekä schisandriini C:n vaikutusta inkluusioiden muodostumiseen ja inkluusiomäärään (kuvat 9-12). Jokaisesta näytteestä tehtiin 2 replikaattia ja kustakin laskettiin 8 kuvan keskiarvojen tulos (taulukko 1).



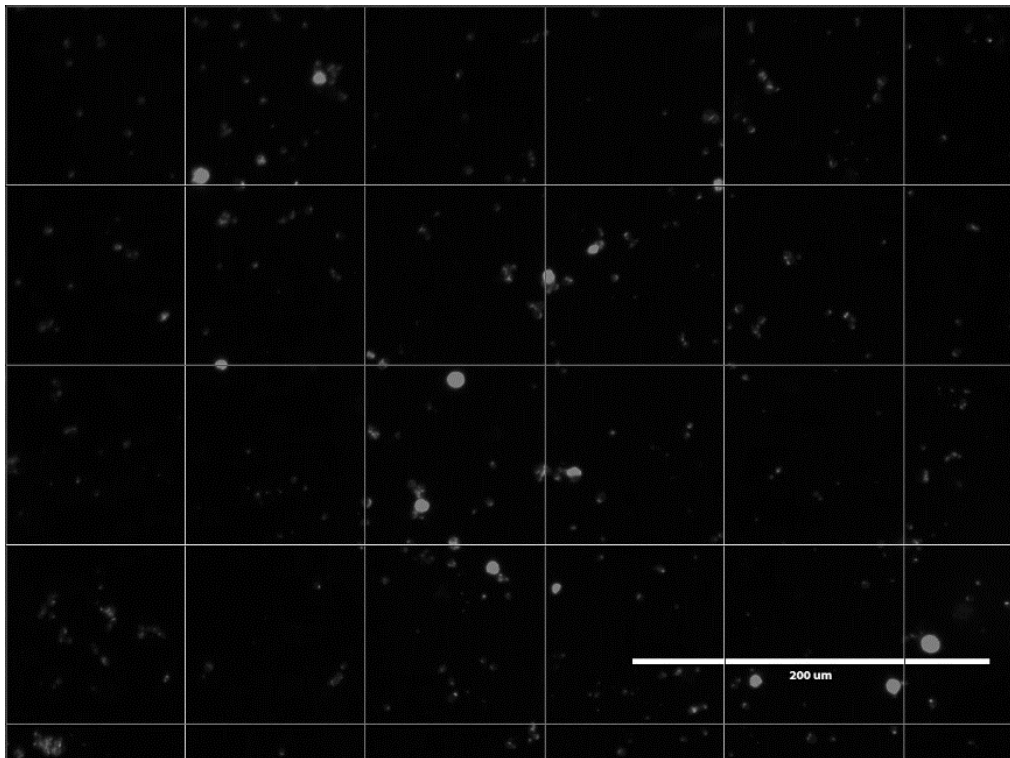
Kuva 9. Sykloheksimidinegatiivinen kontrolli.



Kuva 10. Sykloheksimidiposiitivinen kontrolli.



Kuva 11. Sykloheksimidinegatiivinen 50  $\mu$ M schisandriini C näyte.



Kuva 12. Sykloheksimidiposiitiivinen 50  $\mu$ M schisandriini C näyte.

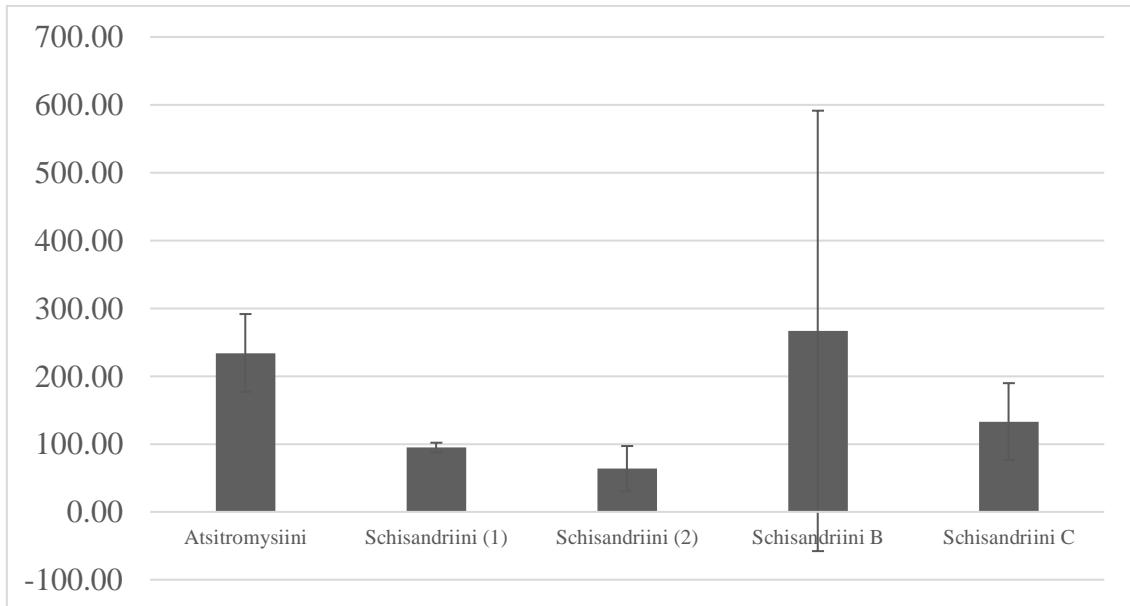
Taulukko 1. Sykloheksimidin, atsitromysiinin, sekä schisandriini C:n vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin inkluusiomuodostukseen HL-soluissa.

Näyte	CHX- keskiarvo (n = 8)	CHX+ keskiarvo (n = 8)
Atsitromysiini	8,25	0,625
Infektiokontrolli	57,625	296,5
SchC 10 $\mu$ M	39,75	241
SchC 25 $\mu$ M	50,125	226,75
SchC 50 $\mu$ M	20,75	10,625

Kuvista 9–12 on selvästi nähtävissä, että sykloheksimidia sisältävissä kontrolleissa ja näytteissä inkluusiot muodostuivat helpommin tulkittaviksi, pyöreiksi alueiksi. Sykloheksimidinegatiivissa näytteissä oli puolestaan hirveästi epämääräisiä laikkuja ja alueita, joita oli vaikea tulkita ja laskea. Inkluusioiden rajat eivät myöskään olleet yhtä selvät, josta hyvin todennäköisesti johtuu pienempi inkluusiomäärä CHX-negatiivisissa tuloksissa taulukossa 1. Atsitromysiini ja schisandriini C 50  $\mu$ M konsentraatiolla selvästi estivät inkluusion muodostusta (sykloheksamidiposiitivissa näytteissä kontrolli 296,5 vrt. 0,625 ja 10,625 inkluusiota vastaavasti).

## 6.2 Atsitromysiinin ja schisandriinien vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin kulkeutumiseen HL-soluista THP-1-soluihin

Seuraavaksi tutkittiin atsitromysiinin ja schisandriinien vaikutusta *C. pneumoniae* -bakteerin siirtymiseen HL-soluista THP-1-soluihin yhteissoluviljelmässä. Kutakin yhdistettä tutkittiin kahdella replikaatilla. Tulosten määrittämisessä käytettiin qPCR-menetelmää. Tulokset on esitetty alla graafisessa muodossa (kuva 13) ja numeerisina arvoina taulukkona (taulukko 2).



Kuva 13. Atsitromysiinin ja schisandriinien vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin kulkeutumiseen HL-soluista THP-1-soluihin (n = 2).

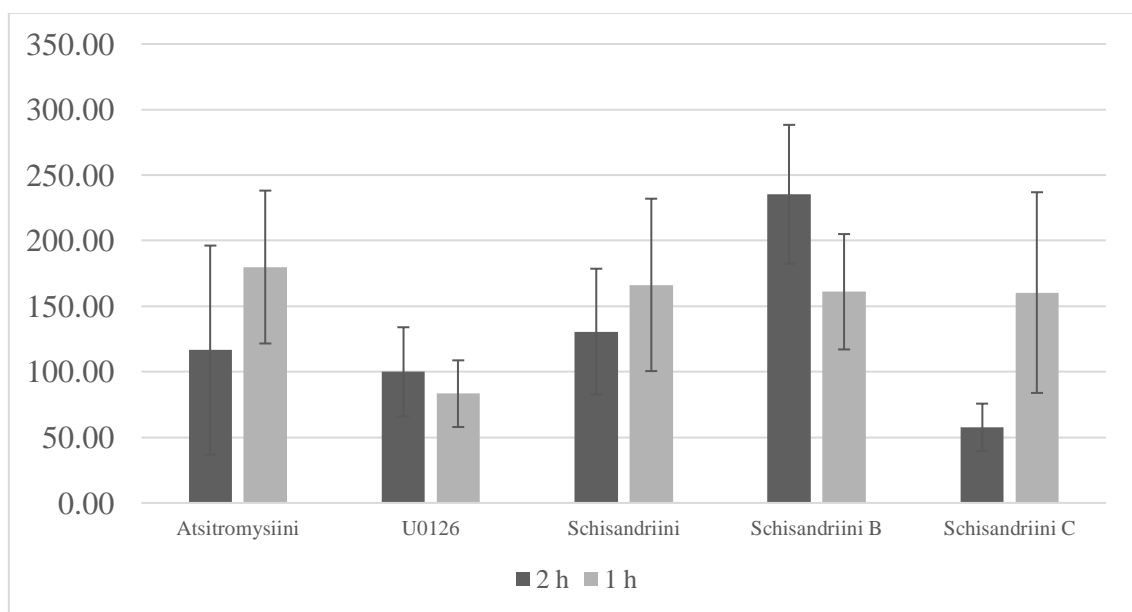
Taulukko 2. Atsitromysiinin ja schisandriinien vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin kulkeutumiseen HL-soluista THP-1-soluihin (n = 2).

Yhdiste	Suhteellinen infektiotaste
Atsitromysiini	234,19 ± 57,38 %
Schisandriini (1)	94,77 ± 7,16 %
Schisandriini (2)	63,68 ± 33,35 %
Schisandriini B	266,77 ± 324,58 %
Schisandriini C	133,09 ± 56,64 %

Yhdisteistä atsitromysiinillä ja schisandriini B:llä näyttäisi olevan toivottua *C. pneumoniae* -bakteerin THP-1-soluihin kulkeutumista estävää vaikutusta päinvastainen, kulkeutumista voimistava vaikutus (234,19 ± 57,38 % ja 266,77 ± 324,58 % vastaavasti). Puolestaan schisandriinilla ei näyttäisi juurikaan olevan, tai että vaikutus olisi pienehkö bakteerin THP-1-soluihin kulkeutumiseen (94,77 ± 7,16 % ja 63,68 ± 33,35 % kahdessa eri kokeessa). Schisandriini C:llä ei ollut juurikaan vaikutusta, mutta pienehkö nousu THP-1-soluihin kulkeutuneessa bakteerimäärässä oli huomattavissa (133,09 ± 56,64 %).

### 6.3 Atsitromysiinin, U0126-yhdisteen ja schisandriinien vaikutus *Chlamydia pneumoniae* -bakteerin internalisaatioon THP-1-soluihin

Koska tutkituilla yhdisteillä ei näyttänyt olla juurikaan vaikutusta, tai jopa päinvastainen vaikutus yhteissoluviljelmissä, päätettiin tutkia yhdisteitä, joilla olisi mahdollisesti estävä vaikutus *Chlamydia pneumoniae* -bakteerin internalisaatioon THP-1-soluihin. Tutkimukseen valittiin ensin atsitromysiini, U0126, sekä kaikki kolme schisandriiniyhdistettä. Kutakin yhdistettä tutkittiin kahdella biologisella replikaatilla. Tulosten määrittämisessä käytettiin qPCR-menetelmää. Tulokset ovat esitetty alla graafisessa (kuva 14) sekä taulukkomuodossa (taulukko 3). Kullekin yhdisteelle tehtiin kaksi ryhmää: toinen, jossa bakteerisoluja inkuboitiiin jäällä tunnin verran, sekä toinen, jossa jäällä inkubointiaika oli kaksi tuntia. Jatkotutkimuksia varten valittiin kahden tunnin inkubaatio, sillä ryhmien välillä ei huomattu johdonmukaista eroa.



Kuva 14. Atsitromysiinin, U0126:n ja schisandriinien vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin internalisaatioon THP-1-soluihin (n = 2).



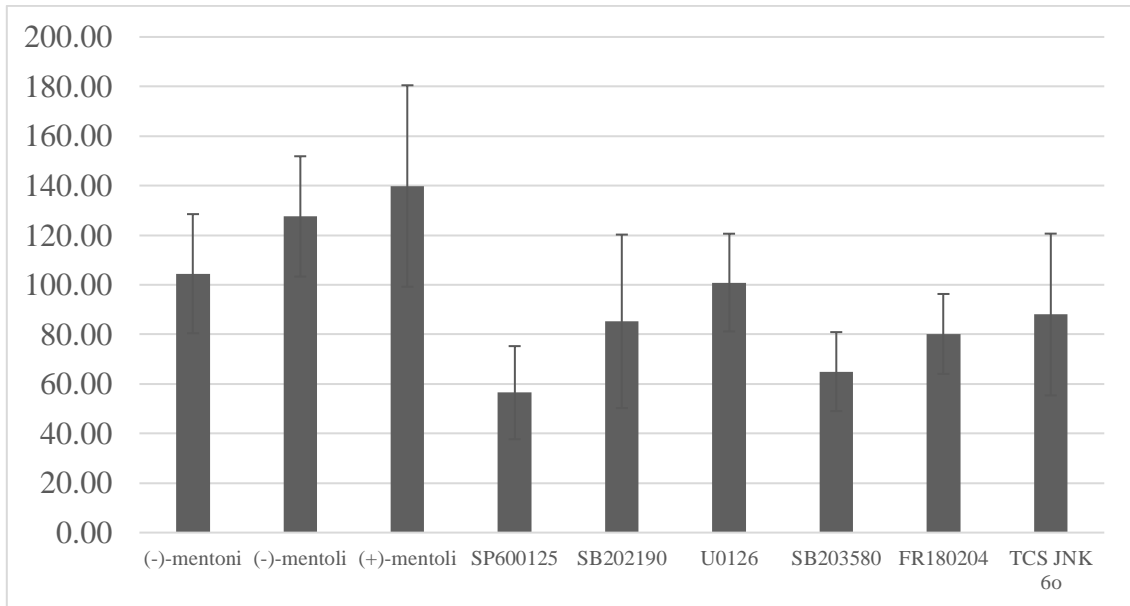
Taulukko 3. Atsitromysiinin, U0126:n ja schisandriinien vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin internalisaatioon THP-1-soluihin (n = 2).

Yhdiste	Suhteellinen internalisaatioaste	
	2 h	1 h
Atsitromysiini	116,52 ± 79,72 %	179,88 ± 58,29 %
U0126	99,95 ± 34,03 %	83,30 ± 25,42 %
Schisandriini	130,61 ± 47,99 %	166,27 ± 65,74 %
Schisandriini B	235,34 ± 52,98 %	161,04 ± 43,98 %
Schisandriini C	57,60 ± 18,12 %	160,42 ± 76,53 %

Tunnin inkubaatioilla tulokset olivat hyvin saman tyylliset keskenään atsitromysiinillä ja kaikilla kolmella schisandriinilla. Kaikki lisäsivät *C. pneumoniae* -bakteerin internalisoitumista THP-1-soluihin jonkun verran (atsitromysiini 179,88 ± 58,29 %, schisandriini 166,27 ± 65,74 %, schisandriini B 161,04 ± 43,98 % ja schisandriini C 160,42 ± 76,53 %). Kahden tunnin inkubaatioissa tuloksissa oli puolestaan hieman hajontaa. Atsitromysiini ja schisandriini lisäsivät bakteerin internalisoitumista THP-1-soluihin hieman (116,52 ± 79,72 % ja 130,61 ± 47,99 % vastaavasti), kun taas schisandriini B lisäsi internalisoitumista huomattavasti (235,34 ± 52,98 %). Schisandriini C puolestaan heikensi *C. pneumoniae* -bakteerin internalisoitumista THP-1-soluihin kahden tunnin inkubaatioajalla (57,60 ± 18,12 %). Yhdisteistä U0126:lla ei ollut merkittävää vaikutusta tunnin, eikä kahden tunnin inkubaatioajoilla (83,30 ± 25,42 % ja 99,95 ± 34,03 % vastaavasti).

#### 6.4 Atorvastatiinin, $\beta^{2,2}$ -aminohappojohdannaisten, mentoli- ja mentoniyhdisteiden, sekä MAPK-inhibiittoreiden vaikutus *Chlamydia pneumoniae* -bakteerin internalisaatioon THP-1-soluihin

Aiemmassa kokeessa ei huomattu johdonmukaista vaikutusta THP-1-solujen internalisaatioon valituilla yhdisteillä, joten seuraavaksi päätettiin seuloa mahdollisia yhdisteitä, joilla voitaisiin saada haluttu vaikutus. Jokaista yhdistettä tutkittiin kahdella biologisella replikaatilla. Yhdisteiksi aluksi valittiin (-)-mentoni, (-)- ja (+)-mentoli, sekä MAPK-inhibiittorit SP600125, SB202190, jo aiemmin testattu U0126, SB203580, FR180204, sekä TCS JNK 60. Tulosten määrittämisessä käytettiin qPCR-menetelmää. Kokeesta saadut tulokset ovat esitetty alla graafisessa (kuva 15) sekä taulukkomuodossa (taulukko 4).



Kuva 15. Mentoli- ja mentoniyhdisteiden, sekä MAPK-inhibiittorien vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin internalisaatioon THP-1-soluihin (n = 2).

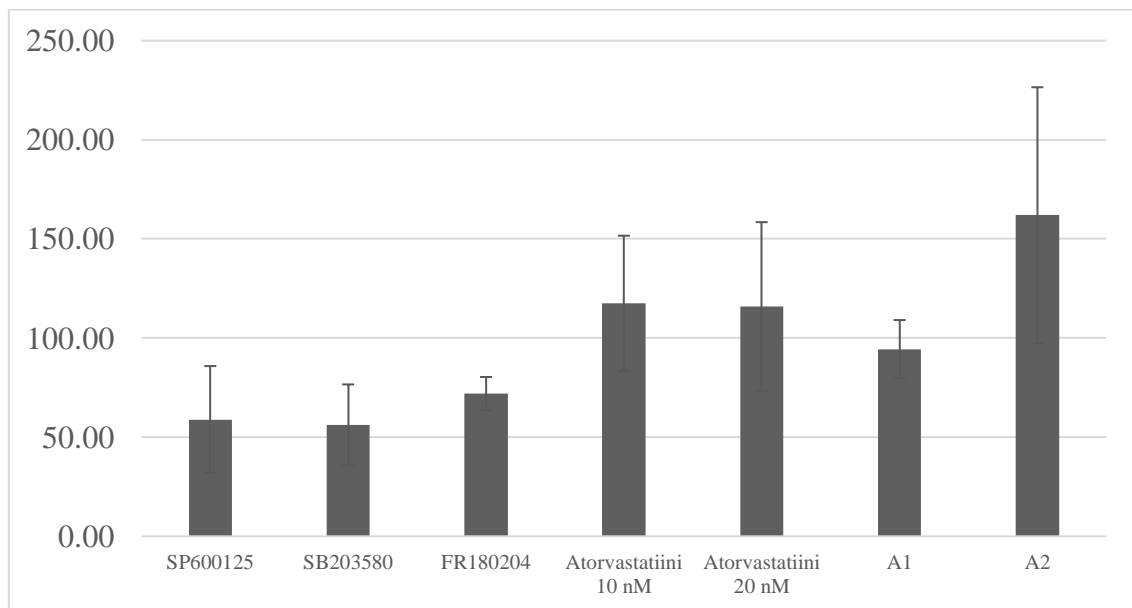
Taulukko 4. Mentoli- ja mentoniyhdisteiden, sekä MAPK-inhibiittorien vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin internalisaatioon THP-1-soluihin (n = 2).

Yhdiste	Suhteellinen internalisaatioaste
(-)-mentoni	104,48 ± 24,03 %
(-)-mentoli	127,57 ± 24,28 %
(+)-mentoli	139,83 ± 40,66 %
SP600125	56,47 ± 18,77 %
SB202190	85,26 ± 34,99 %
U0126	100,88 ± 19,73 %
SB203580	64,95 ± 15,93 %
FR180204	80,16 ± 16,13 %
TCS JNK 60	87,99 ± 32,65 %

(-)-mentoni-, sekä (-)- ja (+)-mentoniyhdisteillä ei ollut juurikaan vaikutusta, tai lievä *C. pneumoniae* -bakteerin THP-1-soluihin internalisoitumista voimistava vaikutus (104,48 ± 24,03 %, 127,57 ± 24,28 % ja 139,83 ± 40,66 % vastaavasti). MAPK-inhibiittoreista SB202190-, U0126- ja TCS JNK 60 -yhdisteillä ei ollut juurikaan estävää vaikutusta bakteerin THP-1-soluihin internalisoitumiseen (85,26 ± 34,99 %, 100,88 ± 19,73 % ja 87,99 ± 32,65 % vastaavasti).

Puolestaan MAPK-inhibiittoreista SP600125-, SB203580- ja FR180204-yhdisteillä oli huomattavin inhibitorinen vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin internalisoitumisessa

THP-1-soluihin ( $56,47 \pm 18,77$  %,  $64,95 \pm 15,93$  % ja  $80,16 \pm 16,13$  % vastaavasti). Estävä vaikutus haluttiin vahvistaa toistamalla eksperimentti. Näiden kolmen MAPK-inhibiittorin lisäksi tutkittavaksi valittiin atorvastatiini kahdella eri pitoisuudella (10 nM ja 20 nM), sekä  $\beta^{2,2}$ -aminohappojohdannaiset A1 ja A2 5  $\mu$ M pitoisuudella. Tässä ko-  
keessa jokaista yhdistettä tutkittiin kolmella biologisella replikaatilla. Tulosten määri-  
tyksessä käytettiin qPCR-menetelmää. Saadut tulokset ovat esitetty alla graafisessa (ku-  
va 16) ja taulukkomuodossa (taulukko 5).



Kuva 16. MAPK-inhibiittorien, atorvastatiinin (10 nM ja 20 nM), sekä  $\beta^{2,2}$ -aminohappojohdannaisten vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin internalisaatioon THP-1-soluihin (n = 3).

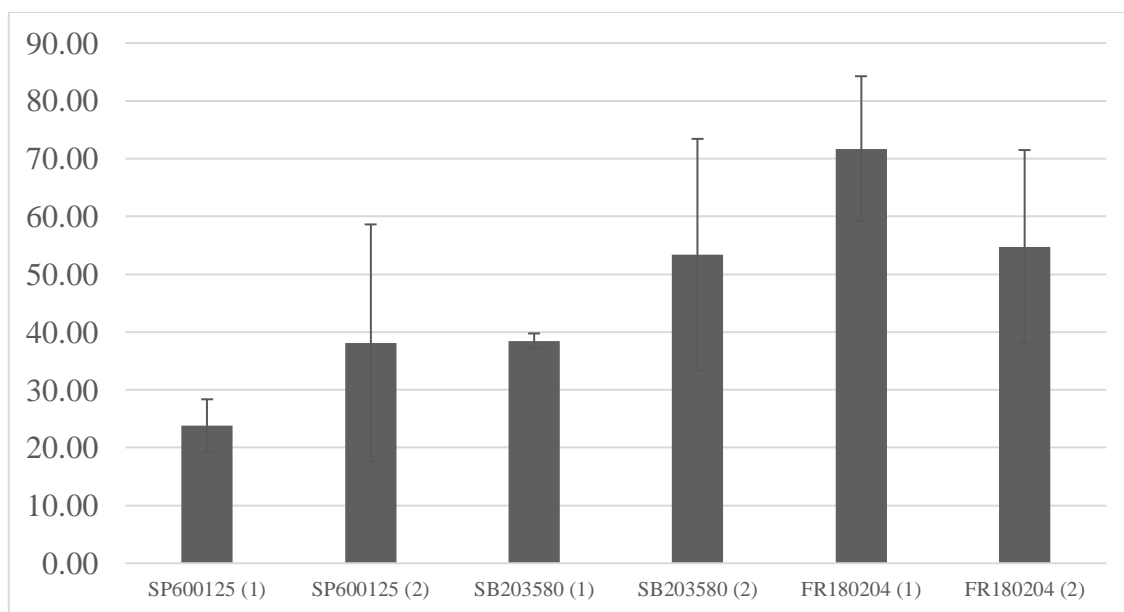
Taulukko 5. MAPK-inhibiittorien, atorvastatiinin (10 nM ja 20 nM), sekä  $\beta^{2,2}$ -aminohappojohdannaisten vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin internalisaatioon THP-1-soluihin (n = 3).

Yhdiste	Suhteellinen internalisaatioaste
SP600125	58,90 ± 26,98 %
SB203580	56,20 ± 20,41 %
FR180204	71,97 ± 8,40 %
Atorvastatiini 10 nM	117,48 ± 34,16 %
Atorvastatiini 20 nM	115,95 ± 42,52 %
A1	94,41 ± 14,69 %
A2	162,01 ± 64,52 %

Ei atorvastatiinilla (10 nM ja 20 nM pitoisuus  $117,48 \pm 34,16$  % sekä  $115,95 \pm 42,52$  % vastaavasti), eikä sekä  $\beta^{2,2}$ -aminohappojohdannalla (A1 ja A2  $94,41 \pm 14,69$  % sekä  $162,01 \pm 64,52$  % vastaavasti) huomattu inhibitorista vaikutusta *C. pneumoniae* -bakteerin internalisoitumisessa THP-1-soluihin. Näistä A2-yhdisteellä oli internalisaatiota lisäävä vaikutus. Kuitenkin aiemmassa kokeessa saatu hypoteesi SP600125-, SB203580- ja FR180204-entsyymi-inhibiittoreiden *C. pneumoniae* -bakteerin THP-1-soluihin internalisoitumista inhiboivasta vaikutuksesta sai vahvistusta ( $58,90 \pm 26,98$  %,  $56,20 \pm 20,41$  % ja  $71,97 \pm 8,40$  % vastaavasti). Kyseiset yhdisteet päätettiin siis ottaa jatkotutkimuksiin ja tutkia niiden vaikutusta yhteissoluviljelmässä.

#### 6.5 MAPK-inhibiittorien (SP600125, SB203580 ja FR180204) vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin kulkeutumiseen HL-soluista THP-1-soluihin

SP600125-, SB203580- ja FR180204-yhdisteiden estävää vaikutusta *C. pneumoniae* -bakteerin kulkeutumiseen HL-soluista THP-1-soluihin tutkittiin kutakin yhdistettä kahdessa eri tutkimuksessa, kummassakin kahdella biologisella replikaatilla. Tulosten määrittämisessä käytettiin qPCR-menetelmää. Tulokset on esitetty alla graafissa (kuva 17) ja taulukkomuodossa (taulukko 6).



Kuva 17. SP600125-, SB203580- ja FR180204-entsyymi-inhibiittorien vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin kulkeutumiseen HL-soluista THP-1-soluihin (n = 2).

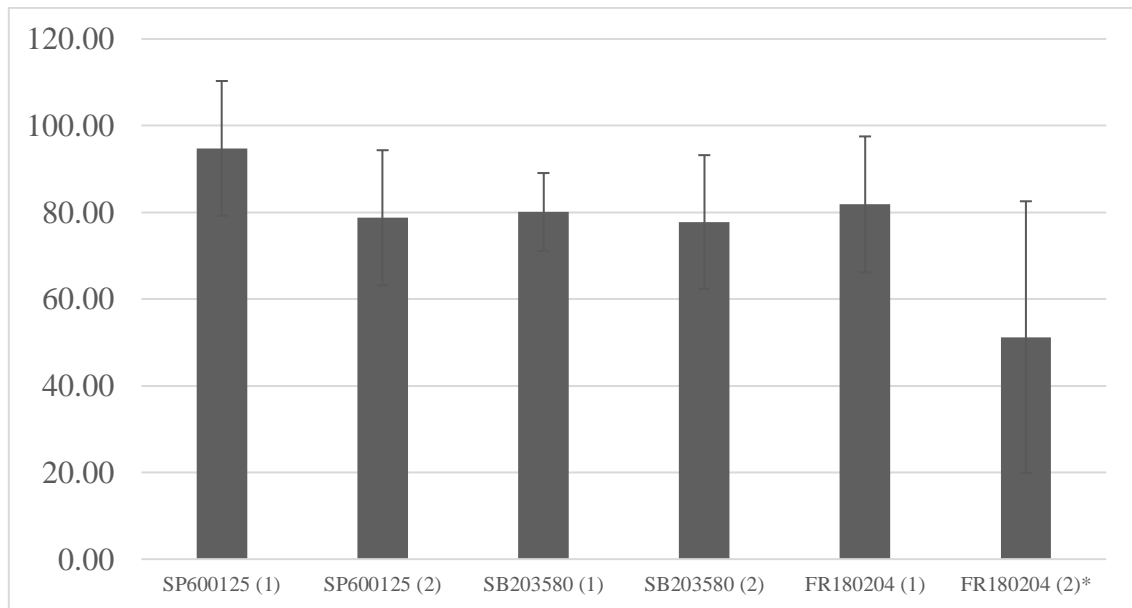
Taulukko 6. SP600125-, SB203580- ja FR180204-entsyymi-inhibiittorien vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin kulkeutumiseen HL-soluista THP-1-soluihin (n = 2).

Yhdiste	Suhteellinen infektioste
SP600125 (1)	23,80 ± 4,57 %
SP600125 (2)	38,10 ± 20,52 %
SB203580 (1)	38,47 ± 1,30 %
SP600125 (2)	53,41 ± 20,02 %
FR180204 (1)	71,70 ± 12,56 %
FR180204 (2)	54,77 ± 16,72 %

SP600125-, SB203580- ja FR180204-entsyymi-inhibiittoreilla huomattiin inhibitorinen vaikutus myös yhteissoluviljelmässä ( $30,95 \pm 16,63$  %,  $45,94 \pm 16,02$  % ja  $63,24 \pm 10,33$  % vastaavasti (n = 4, biologiset replikaatit yhdistetty)). Todennäköinen vaikutus johtuu jo aiemmin todetusta THP-1-soluun internalisoitumisen estymisestä, mutta tutkimuksessa haluttiin vielä tutkia mahdollinen vaikutus MAPK-inhibiittoreilla esikäsitellyillä *Chlamydia pneumoniae* -bakteereilla HL-soluihin internalisoitumisessa.

#### 6.6 MAPK-inhibiittorien (SP600125, SB203580 ja FR180204) vaikutus esikäsitellyiden *C. pneumoniae* -bakteereiden internalisaatioon HL-soluihin

SP600125-, SB203580- ja FR180204-yhdisteiden vaikutusta esikäsitellyiden *C. pneumoniae* -bakteereiden internalisaatioon HL-soluihin tutkittiin kahdessa eri kokeessa. Molemmista jokaista yhdistettä tutkittiin kolmella biologisella replikaatilla. Tulosten määrittämisessä käytettiin qPCR-menetelmää. Tutkimuksessa saadut tulokset on esitetty alla graafisessa (kuva 18) ja taulukkomuodossa (taulukko 7).



Kuva 18. SP600125-, SB203580- ja FR180204-entsyymi-inhibiittorien vaikutus *C. pneumoniae* -bakteereiden internalisaatioon esikäsiteltyihin HL-soluihin (n = 3).

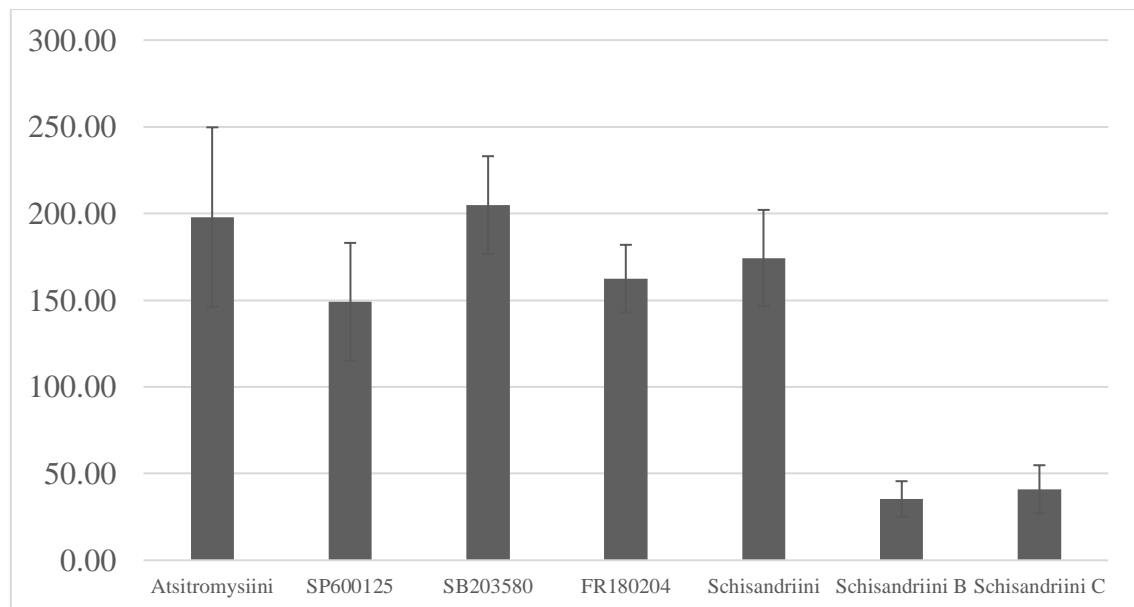
Taulukko 7. SP600125-, SB203580- ja FR180204-entsyymi-inhibiittorien vaikutus *C. pneumoniae* -bakteereiden internalisaatioon esikäsiteltyihin HL-soluihin (n = 3).

Yhdiste	Suhteellinen infektiotaso
SP600125 (1)	94,77 ± 15,53 %
SP600125 (2)	78,74 ± 15,59 %
SB203580 (1)	80,07 ± 9,00 %
SB203580 (2)	77,77 ± 15,42 %
FR180204 (1)	81,83 ± 15,69 %
FR180204 (2)*	51,21 ± 31,35 %

Esikättelykokeessa kaikilla yhdisteillä huomattiin lievä inhibitorinen vaikutus, jota ei kuitenkaan todettu tilastollisesti merkittäväksi (SP600125  $85,92 \pm 16,94$  %, SB203580  $84,20 \pm 9,55$  % ja FR180204  $70,83 \pm 25,19$  % (n = 6, biologiset replikaatit yhdistetty)). Jälkimmäisenä toteutetun kokeen FR180204-entsyymi-inhibiittorin tulos (FR180204 (2)) on merkitty tähdellä, koska yhden biologisen replikaatin tulos poikkesi aiemmassa saadusta kokeesta, jonka tulokset olivat linjassa kokeen jälkimmäisen kokeen muiden replikaattien tulosten kanssa. Kuitenkin poikkeavan tuloksen teknisten replikaattien arvot olivat yhtenevät, eikä niitä voitu katsoa olevan merkittävästi poikkeavat käyttäen Gruppstin testiä. Tulokset kuitenkin aiheuttavat huomattavan keskihajonnan, sekä selvästi muista MAPK-inhibiittoreista poikkeavan tuloksen.

### 6.7 Atsitromysiinin, SP600125-, SB203580- ja FR180204-entsyymi-inhibiittorien, sekä schisandriinien vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin jälleeniinfektiokykyyn

Kirjallisuudesta tiedetään, että schisandriini B:llä ja C:llä on inhibitorinen vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin jälleeniinfektiokykyyn (infectious progeny) (Hakala ym. 2015). Tutkimuksessa päätettiin siis tutkia yhteissoluviljelmissä *C. pneumoniae* -bakteerin HL-soluista THP-1-soluihin kulkeutumista estäneiden yhdisteiden, sekä atsitromysiinin vaikutusta tähän. Tulokset on esitetty alla graafisessa (kuva 19) ja taulukkomuodossa (taulukko 8).



Kuva 19. Atsitromysiinin, SP600125-, SB203580- ja FR180204-entsyymi-inhibiittorien, sekä schisandriinien vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin jälleeniinfektiokykyyn HL-soluilla (n = 3).

Taulukko 8. Atsitromysiinin, SP600125-, SB203580- ja FR180204-entsyymi-inhibiittorien, sekä schisandriinien vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin jälleeninfektiokykyyn HL-soluilla (n = 3).

Yhdiste	Infektioaste (%)
Atsitromysiini	197,96 ± 51,76 %
SP600125	149,09 ± 33,96 %
SB203580	204,83 ± 28,23 %
FR180204	162,39 ± 19,55 %
Schisandriini	174,26 ± 27,81 %
Schisandriini B	35,36 ± 10,26 %
Schisandriini C	40,93 ± 13,91 %

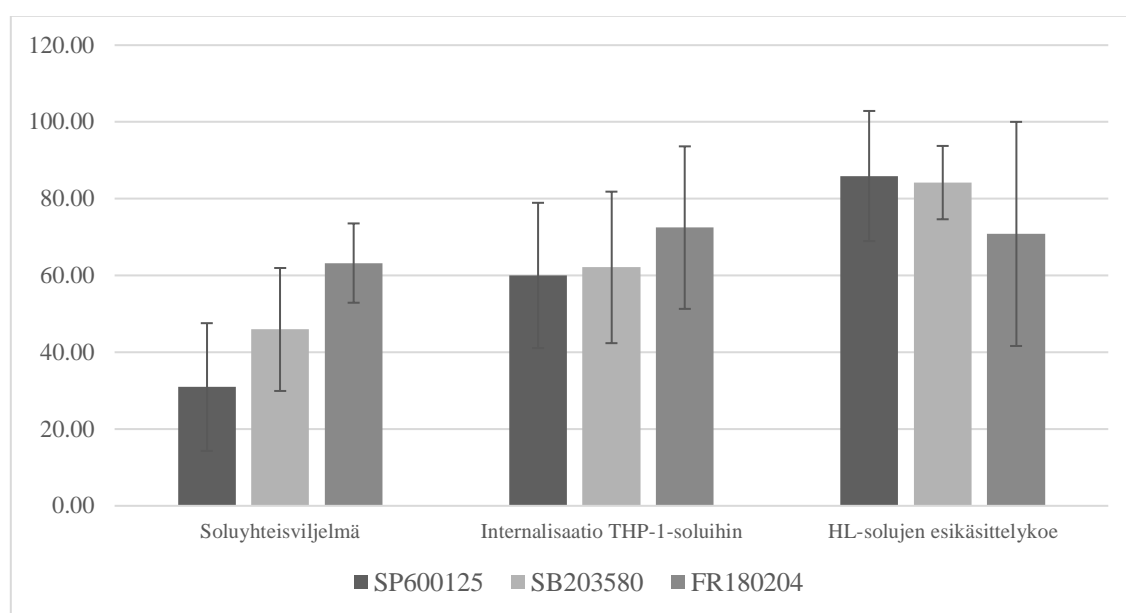
Muilla yhdisteillä, kuin schisandriini B:llä ja C:llä ei todettu olevan inhibitorista vaikutusta ( $35,36 \pm 10,26$  % ja  $40,93 \pm 13,91$  % vastaavasti). Mielenkiintoista oli se, että THP-1-internalisaatiota estävät MAPK-inhibiittorit näyttäisivät lisäävän *C. pneumoniae* -bakteerin jälleeninfektiokykyä (SP600125  $149,09 \pm 33,96$  %, SB203580  $204,83 \pm 28,23$  % ja FR180204  $162,39 \pm 19,55$  %). Myös atsitromysiinillä ja schisandriinilla huomattiin olevan jälleeninfektiokykyä lisäävä vaikutus ( $197,96 \pm 51,76$  % ja  $174,26 \pm 27,81$  % vastaavasti).

## 6.8 Tulosten yhteenveto

HL-THP-1-yhteissoluviljelmässä erotteluprotokollalla THP-1-soluihin siirtyneen *Chlamydia pneumoniae* -bakteerin kokonaisgenomin määrää ja eri yhdisteiden vaikutusta siihen tutkittiin atsitromysiinillä, kaikilla schisandriineilla, atorvastatiinilla, molemmilla  $\beta^{2,2}$ -aminohappojohdannaisilla ja MAPK-inhibiittoreista JNK-inhibiittori SP600125, MAPKAP-kinaasi-2-inhibiittori SB203580 ja ERK1/ERK2-inhibiittori FR180204. Muut kokeet (internalisaatio, solusta vapautuminen ja infektiivisyys) suoritettiin pääasiassa atorvastatiinilla, schisandriineilla ja MAPK-inhibiittoreista SP600125, SB203580 ja FR180204, paitsi THP-1-internalisaatiokokeissa käytettiin kaikkia yhteissoluviljelmässäkin käytettyjä yhdisteitä, joiden lisäksi internalisaatiota tutkittiin myös atorvastatiinilla, (-)-mentonilla, (-)-mentolilla, sekä (+)-mentolilla ja MAPK-inhibiittoreista myös SB202190, U0126, sekä TCS JNK 6o.



Ei schisandriineilla, atorvastatiinilla, eikä  $\beta^{2,2}$ -aminohappojohdannaisilla huomattu olevan estävää vaikutusta HL-THP-1-yhteissoluviljelmässä siirtyneiden bakteerien määrään, kun taas tutkituista yhdisteistä lupaavimmiksi osoittautuivat MAPK-inhibiittorit SP600125, SB203580 ja FR180204. Näillä yhdisteillä saatiin merkittävimmät tulokset yhteissoluviljelmissä, eikä niillä ollut juurikaan vaikutusta *Chlamydia pneumoniae* -bakteerin infektiivisyyteen esikäsittelykokeissa, eikä käytettyjen solulinjojen toimintaan. Merkittävimmät tulokset on esitetty graafisesti kuvassa 20 ja taulukkomuodossa taulukossa 9.



Kuva 20. MAPK-inhibiittorien SP600125-, SB203580- ja FR180204 vaikutus *Chlamydia pneumoniae* -bakteerin kulkeutumiseen THP-1-soluihin HL-soluista yhteissoluviljelmässä (n = 4), vaikutus bakteerin internalisoitumiseen THP-1-soluihin (n = 6), sekä vaikutus HL-soluinternalisaatioon esikäsittelykokeessa (n = 3).

Taulukko 9. MAPK-inhibiittorien SP600125-, SB203580- ja FR180204 vaikutus *Chlamydia pneumoniae* -bakteerin kulkeutumiseen THP-1-soluihin HL-soluista yhteissoluviljelmässä (n = 4), vaikutus bakteerin internalisoitumiseen THP-1-soluihin (n = 6), sekä vaikutus HL-soluinternalisaatioon esikäsittelykokeessa (n = 3).

Yhdiste	Yhteissoluviljelmä	Internalisaatio THP-1-soluihin	Esikäsittelykoe HL-soluilla
SP600125	30,95 ± 16,63 %	60,02 ± 18,92 %	85,92 ± 16,94 %
SB203580	45,94 ± 16,02 %	62,11 ± 19,47 %	84,20 ± 9,55 %
FR180204	63,24 ± 10,33 %	72,47 ± 21,17 %	70,83 ± 25,19 %

Tilastollisesti MAPK-inhibiittorien vaikutus yhteissoluviljelmään oli merkittävä: SP600125-yhdisteellä  $p = 0,00001$ , SB203580-yhdisteellä  $p = 0,0002$  ja FR 180204-yhdisteellä  $p = 0,009$ . Internalisaatiokokeissa THP-1-soluihin tilastollista merkittävyyttä oli SP600125- ja SB 203580-yhdisteillä ( $p = 0,026$  ja  $p = 0,035$  vastaavasti), kun taas FR180204-yhdisteellä ei ollut tilastollista merkittävyyttä, vaikka se vaikuttikin THP-1-soluihin internalisaatioon. Vaikka kyseisillä yhdisteillä olikin vaikutusta HL-soluista vapautuviin bakteereihin, ei niillä ollut tilastollista merkittävyyttä. Tilastollinen merkittävyys on laskettu yksisuuntaisella ANOVA- ja Dunnetin post hoc -testeillä.

## 7 POHDINTA

Yhteys useisiin kroonisiin sairauksiin eri puolilla kehoa ja *Chlamydia pneumoniae* -bakteerin kyky siirtyä primääri-infektiopaikalta – keuhkoepiteelistä – muun muassa vazoendoteeliin valkosolujen välityksellä asettaa haasteen ja tarpeen selvittää voiko näitä siirtymisiä estää. Vaikka aiemmin tutkittu *C. pneumoniae* -infektion kulkeutumisen esto valkosoluista kardiovaskulaarikudokseen tuottaisi tulosta, ei se pois sulkisi mahdollista yhteyttä Alzheimerin tautiin, tai muihin sairauksiin ateroskleroosin lisäksi. Tämän lisäksi bakteeri pystyisi pitämään yllä hiljaista infektiota, sekä aiheuttamaan jälleinfektioita, mikäli se pääsisi infektoimaan valkosoluja ja kiertäisi niiden sisällä – persistentissä muodossa – kehossa. Tämän kannalta olisi siis äärimmäisen tärkeää löytää yhdiste, joka estäisi *C. pneumoniae* -bakteerin siirtymisen itse keuhkoepiteelistä valkosoluihin.

Jotta löydettäisiin yhdiste, jolla voidaan estää *C. pneumoniae* -bakteerin kulkeutuminen valkosoluihin *in vivo*, tulee asiaa tutkia tätä ennen myös *in vitro*. Haasteena kuitenkin on vastaavien tutkimusten vähäisyys, mutta Kortesoja ym. (2020) otti askeleen lähemmäs tutkimusasetelman löytymistä. HL-A2-biotiini-streptavidiini-nanohelmi-konjugoinnilla saadaan erittäin puhdas saanto elinkelpoisia, *C. pneumoniae* -infektoituja THP-1-soluja, joilla voidaan suorittaa jatkotutkimuksia. Ennen varsinaisia tutkimuksia antiklamydiaalisen yhdisteen löytymiseksi, tulee löytää positiivinen kontrolli *in vitro* -tutkimuksiin ja selvittää sen varsinainen vaikutuskohta HL-THP-1-yhteissoluviljelmässä. Onneksi yhteissoluviljelmiä protokolla on jaettavissa sen jokaiseen erilliseen mahdolliseen tapahtumaan, jossa *C. pneumoniae* -bakteeri joko vapautuu tietystä solutyypistä tai internalisoituu tiettyyn solutyypin.

HL-TPH-1-yhteissoluviljelmän protokollassa haastavinta on sen työläys, jonka takia kerralla tutkittavaksi määräksi yhteissoluviljelmässä THP-1-solujen erotteluun todettiin olevan kaksi kontrollia ja kaksi tutkittavaa yhdistettä sisältävää näytettä. Kuitenkin internalisaatiokokeissa, niin HL-soluihin kuin THP-1-soluihinkin, pystyttiin tutkimaan jopa 24 näytettä samaan aikaan. Lisätulokset yhteissoluviljelmässä vaatisivat siis vielä reilusti toistoja (n-luvun kasvattamista) protokollan optimoimiseksi.

Kuten biologisissa tutkimuksissa yleensä, tulosten keskihajonta oli huomattavaa. kuitenkin tällä ei pitäisi olla merkitystä, sillä tulokset olivat pääasiassa saman suuntaisi *C. pneumoniae* -bakteerin estossa THP-1-soluihin internalisaatioon niin yksöissoluviljelmissä, kuin yhteissoluviljelmissäkin. Biologisten replikaattien tulokset saattoivat olla tutkimuksissa eri toistokerroilla eri kymmenkertaluvuissa (qPCR-ajojen *C. pneumoniae* -bakteerin genomiluku oli  $10^4$ – $10^8$ ), mutta suhteutettuna sen kerran kontroleihin, olivat ne aina suurin piirtein yhtenevät. Tämä viittaa siihen, että jokaisella toistokerralla kaikki replikaatit saivat pääasiassa yhtenevän käsittelyn ja *C. pneumoniae* -bakteeri käyttäytyi samalla tavalla, mutta toistokertojen välillä bakteerin infektiivisyydessä oli jonkin verran eroja. Keskihajontaa tutkimuksissa voitaisiin pienentää lisäämällä biologisia replikaatteja.

Toinen hajontaan vaikuttava seikka on PCR-ajojen tulokset. Välillä yhden biologisen replikaatin tuloksista tehdyistä kahdesta teknisestä replikaatista tulos saatiin luettua vain toisesta. Todennäköisen selitys näille virheille on pipetointivirheet. Pipetoitavat määrät PCR-levylle olivat erittäin pieniä (pienimmät 0,4 µl) ja mikäli kaikkia komponentteja ei saatu yhteen kuoppaan, ei PCR-reaktio onnistu. Näidenkin virheiden merkitystä tutkimuksen lopullisissa tuloksissa voitaisiin vähentää lisäämällä tutkimusten toistokertoja.

Dechend ym. (2003) totesi tutkimuksessaan, että serivastatiini vähensi *C. pneumoniae* -bakteerin kulkeutumista makrofageista verisuonten sileisiin lihassoluihin. Tutkimuksessa myös todetaan, että muut HMG-CoA-reduktaasi-inhibiittorit, kuten atorvastaatiini, vähensivät NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) -aktivaatiota. Tässä pro gradu -tutkimuksessa atorvastatiinilla ei huomattu olevan vaikutusta *C. pneumoniae* -bakteerin internalisoitumisessa THP-1-solulinjaan. Todennäköinen selitys tälle on solutyypin (pinta)rakenteiden erilaisuus, ja näin ollen *C. pneumoniae* -bakteerin internalisaatiomekanismit kyseisiin solutyyppeihin.

Aiemmissa tutkimuksissa Hanski ym. (2015 ja 2016) olivat todenneet antimikrobisten peptidien tavoin toimivien A1- ja A2-β<sup>2,2</sup>-aminohappojohdannaisien vähentävän *C. pneumoniae* -bakteerin infektiivisyyttä HL-soluihin. Tässä pro gradu -tutkimuksessa kuitenkin näyttäisi siltä, että A1- ja (-)-mentoni-yhdisteellä ei olisi vaikutusta bakteerin

internalisaatioon THP-1-soluihin, kun taas A2- ja (-)- ja (+)-mentolihdisteillä olisi internalisaatiota lisäävä vaikutus kyseiseen solulinjaan. Tämä saattaa johtua siitä näissä tutkimuksissa inkubaatioaikana internalisaatiokokeissa oli kaksi tuntia, ja yhteissoluviljelmissä yhdisteet olivat tutkittavilla soluilla viisi tuntia. Hanski ym. toteuttamissa kokeissa A1-, A2-, sekä mentoni- ja mentolihdisteet vaikuttivat huomattavasti pidemmän ajan, joten on mahdollista, että yhdisteet vaikuttavat johonkin internalisaation jälkeiseen tapahtumaan tai rakenteeseen, kuten varhaisen inkluusion rakenteeseen tai inkluusiokalvon uudelleen muotoiluun.

Hanskin ym. (2015 ja 2016) tutkimuksessa kvantitatiivisena testinä käytettiin fluoresenssivärjäystä ja inkluusioiden laskemista. Tämä ei ota huomioon varsinaista bakteerimäärää yhden inkluusion sisällä. Voisi siis olla, että esimerkiksi Hanskin tutkimusryhmineen toteuttamissa tutkimuksissa olisi syntynyt vähemmän, suurempia bakteerimääriä sisältäviä inkluusioita, mutta tämä olisi todennäköisesti havaittu soluja mikroskopoidessa. On myös mahdollista, että yhdisteet vaikuttavat eri tavalla eri solulinjoihin ja *C. pneumoniae* -bakteerin internalisaatio THP-1-soluihin (vrt. Hanski ym. tutkimukset HL-soluihin) tapahtuu niin, etteivät A1-, A2-, sekä mentoni- ja mentolihdisteillä ole siihen inhibitorista vaikutusta. Lisätutkimuksia vaaditaan varsinaisen syyn selvittämiseksi.

Hakala ym. (2015) tutki *C. pneumoniae* -bakteerin jälleeniinfektiokykyä HL-soluilta jälleen HL-soluille ja *Schisandra spp.* -kasvien lignaanien vaikutuksesta tähän. Tässä pro gradu -tutkimuksen jälleeniinfektiokykytutkimuksissa saadut tulokset vastasivat Hakalan tutkimusryhmineen esittelemiä tuloksia schisandriinien osalta. Schisandriini B todettiin olevan tehokkain jälleeniinfektioiden estäjä ja schisandriini C:llä oli myös huomattava vaikutus tähän. Puolestaan schisandriinilla ei todettu kyseistä inhibitorista vaikutusta. Kaikki tulokset yhtenivät aiemman kirjallisuuden kanssa.

Schisandriineilla ei huomattu vaikutusta *C. pneumoniae* -bakteerin kulkeutumisessa HL-soluista THP-1-soluihin. Tämä saattaa johtua siitä, että Hakala ym. (2015) totesi, että kyseisten yhdisteiden vaikutuskohta on todennäköisesti infektion loppupuolella, sillä infektion inhibitorisessa vaikutuksessa ei ollut eroa lisättiinkö yhdisteet soluille he-

ti vai kahdeksan tuntia infektion jälkeen. Kuten aiemmin todettiin, tutkittavat aineet olivat soluilla tässä pro gradu -työssä vain 1–5 tunnin ajan. On myös mahdollista, että yhdisteiden vaikutus THP-1-soluihin on erilainen, kuin HL-soluihin.

Hanski ja Vuorela (2016) totesivat tutkimuksessaan, että MAPK-inhibiittorit vähentävät *C. pneumoniae* -inkluusiomäärää HL-soluissa. Heidän tutkimuksessaan tehokkaimmaksi osoittautui ERK1/ERK2-inhibiittori FR180204. Tutkimuksessa inkubaatioaikana oli Hanski ym. (2015 ja 2016) tutkimuksia vastaava 72 tuntia yhdisteiden kanssa. Ilmeisesti näiden yhdisteiden vaikutus kohdistuu kuitenkin infektion alkuvaiheeseen ainakin THP-1-soluilla, sillä tässä pro gradu -tutkielmassa todettiin, että MAPK-inhibiittoreilla oli vaikutus kahden tunnin inkubaatioilla THP-1-internalisaatiokokeissa. Tässä pro gradu -työssä myös huomattiin, että esikäsiteltyjen *C. pneumoniae* -bakteerien internalisointuminen HL-soluihin oli heikentynyt.

MAPK-inhibiittorien SP600125-, SB203580- ja FR180204 *Chlamydiae pneumoniae* -bakteerin kulkeutumista HL-soluista THP-1-soluihin inhiboiva vaikutus johtuu todennäköisesti bakteerin internalisaation estymisestä THP-1-soluihin. Mielenkiintoinen huomio on, että vaikka yhteissoluviljelmässä ja THP-1-soluinternalisaatiokokeessa saadut tulokset ovat yhtenevät, esikäsitelykokeessa saadut tulokset HL-soluihin internalisaatioon ovat käänteiset THP-1-soluihin internalisoituneelle bakteerimäärälle. Tämä HL-soluihin internalisoitumista estävä vaikutus saattaa olla osallisena siis THP-1-soluihin HL-soluista kulkeutuvan *C. pneumoniae* -bakteerimäärän laskuun, mutta todennäköisesti se ei ole pääsyy, sillä muuten yhteissoluviljelmän tulosten tulisi olla linjassa näiden tulosten kanssa. MAPK-signaali ilmenee hyvin erilaisina kaskadeina riippuen solutyypistä. Tämä todennäköisesti selittää sitä, miksi esimerkiksi MAPKAP-kinaasi-2-inhibiittori SP600125 esti tehokkaammin bakteerin internalisoitumista THP-1-soluihin, kun taas tehokkain HL-soluihin internalisaation estäjä oli ERK1/ERK2-inhibiittori FR180204, joka yhtenee Hanskin ja Vuorelan (2016) tulosten kanssa.

Kirjallisuudessa (Elwell ym. 2016; Kim ym. 2011; Mehlitz ja Rudel 2013) tunnetaan *Chlamydia*-suvun vaikutus isäntäsolun viestintään ja metaboliaan ERK-reseptorien kautta. Tämä mahdollisesti selittää FR180204-ERK1/ERK2-inhibiittorin vaikutukset.

Olive ym. (2014) puolestaan totesi JNK-inhibiittori SP600125-yhdisteellä olevan inhibitorisen vaikutuksen *C. trachomatis* -bakteerin infektiossa HEK293T-soluissa (humaani alkion munuaissolulinja). Tutkimuksessa tutkittiin vain kyseisen bakteerisuvun replikoitumista, eikä JNK-entsyymien varsinaista vaikutusta replikaatiosykliin. Heidän tutkimuksessaan kuitenkin selvisi, että ainakin *C. trachomatis* -bakteerin replikoituminen on riippuvaista JNK-entsyymien säätelemästä aktivaattoriproteiini 1 -transkriptiotekijän aktivoitumisesta. Lisätutkimuksia vaaditaan selvittämään JNK- ja MAPKAP-kinaasi-2-entsyymien varsinaisen osallisuus *C. pneumoniae* -bakteerin internalisaatiossa isäntäsoluun.

## 8 JOHTOPÄÄTÖKSET

Maailmanlaajuisesti merkittäväksi osoittautuneen sairastavuuden, ja koska ensisijaisten hengitystieinfektioiden lisäksi *Chlamydia pneumoniae* -bakteeri voidaan liittää tiettyihin pitkäaikaissairauksiin, tulisi kyseisen bakteerisuvun infektioiden kulkua tutkia tarkemmin. Erityisen haastavaa *C. pneumoniae* -infektioiden hoidosta tekee bakteerin kyky muodostaa persistenttejä bakteerimuotoja, joiden häätämiseksi ei ole vielä kehitetty lääkkeitä. Varsinkin valkosoluja infektoimaan edenneet infektiot, jotka eivät tarvitse muita ärsykeitä persistenssin laukaisemiseksi, asettavat suuren haasteen bakteerinfektioiden onnistuneeseen häätämiseen elimistöstä. Näin ollen olisi tärkeää saada infektiot hädettyä ennen tätä siirtymää keuhkoepiteelistä valkosoluihin, tai löytää lääkeaine kulkeutumista estämään.

*Chlamydia pneumoniae* -infektion siirtymistä keuhkoepiteelisoluista valkosoluihin voidaan mallintaa HL-THP-1-yhteissoluviljelmissä, sekä solut voidaan erotella HL-A2-biotiini-streptavidiini-nanohelmikonjugoimalla THP-1-solut, sekä toteuttamalla erottelu magneettisesti. Tässä mallinnuksessa mahdolliseksi positiiviseksi kontrolloiyhdisteeksi *C. pneumoniae* -bakteerin siirtymisen estämisessä HL-soluista THP-1-soluihin osoittautui MAPK-inhibiittorit. Tässä pro gradu -tutkimuksessa todennäköisesti otollisimmaksi vaikutuskohdaksi osoittautui JNK-entsyymien inhibointi SP600125-yhdisteellä. Varsinaisen signaaloinnin muuttuminen ja JNK-entsyymien vaikutus *C. pneumoniae* -bakteerin infektiocyklissä vaatii vielä lisätutkimuksia.



## 9 KIRJALLISUUS

- Abu-Lubad M, Meyer TF, Al-Zeer MA: *Chlamydia trachomatis* inhibits inducible NO synthase in human mesenchymal stem cells by stimulating polyamine synthesis. *J Immunobiol* 193: 2941–2951, 2014
- Aeberhard L, Banhart S, Fischer M, Jehmlich N, Rose L, Koch S, Laue M, Renard BY, Schmidt F, Heuer D: The proteome of the isolated *Chlamydia trachomatis* containing vacuole reveals a complex trafficking platform enriched for retromer components. *PLoS Pathog* 11: e1004883, 2015
- Airanne S, Surcel HM, Alakärppä H, Laitinen K, Paavonen J, Saikku P, Laurila A, Tuomanen EI: *Chlamydia pneumoniae* infection in human monocytes. *67* (3): 1445–1449, 1999
- Airanne S, Surcel HM, Tuukkanen J, Leinonen M, Saikku P: *Chlamydia pneumoniae* inhibits apoptosis in human epithelial and monocyte cell lines. *Scand J Immunol* 55 (4): 390–398, 2002
- Bachmann NL, Polkinghorne A, Timms P: Chlamydia genomics: providing novel I sights into chlamydial biology. *Trends Microbiol* 22 (8): 464–472, 2014
- Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI: Persistent *Chlamydiae*: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev* 58 (4): 686–699, 1994
- Borel N, Summersgill JT, Mukhopadhyay S, Miller RD, Ramirez JA, Pospischill A: Evidence for persistent *Chlamydia pneumoniae* infection of human coronary atheromas. *Atherosclerosis* 199 (1): 154–161, 2007
- Burillo A, Bouza E: *Chlamydophila pneumoniae*. *Infect Dis Clin North Am* 24 (1): 61–71, 2010
- Caldwell HD, Wood H, Crane D, Bailey R, Jones RB, Mabey D, Maclean I, Mohammed Z, Pooling R, Roshick C, Schacher J, Solomon AW, Stamm WE, Suckland RJ, Taylor L, West SK, Quinn TC, Belland RJ, McClarty G: Polymorphisms in *Chlamydia trachomatis* tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates. *J Clin Invest* 111 (11): 1757–1769, 2003
- Carabeo RA, Grieshaber SS, Hasenkrug A, Dooley C, Hackstadt T: Requirement for the Rac GTPase in *Chlamydia trachomatis* invasion of non-phagocytic cells. *Traffic* 5: 418–425, 2004
- Chin E, Kirker K, Zuck M, James G, Hybiske K: Actin recruitment to the *Chlamydia* inclusion is spatiotemporally regulated by a mechanism that requires host and bacterial factors. *PLoS One* 7 (10): e46949, 2012

Conant CG, Stephens RS: *Chlamydia* attachment to mammalian cells requires protein disulfide isomerase. *Cell Microbiol* 9 (1): 222–232, 2007

Cunha BA: The atypical pneumonias: clinical diagnosis and importance. *Clin Microbiol Infect* 12: 12–24, 2006

Damiani MT, Tudela JG, Capmany A: Targeting eukaryotic Rab proteins: a smart strategy for chlamydial survival and replication. *Cell Microbiol* 16 (9): 1329–1338, 2014

Dechend R, Gieffers J, Dietz R, Joerres A, Rupp J, Luft JC, Maass M: Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibition reduces *Chlamydia pneumoniae*-induced cell interaction and activation. *Circulation* 108 (3): 261–265, 2003

Duodecim: Keuhkokuume (online). Lääkärin käsikirja. Suomalaisen Lääkäriseura Duodecim ja Vilhonen H. Helsinki, 2020 (viitattu 08.09.2020). Saatavilla internetistä: [www.terveysportti.fi](http://www.terveysportti.fi)

Duodecim: Lasten keuhkokuume (online). Lääkärin käsikirja. Suomalaisen Lääkäriseura Duodecim ja Heiskanen-Kosma. Helsinki, 2019 (viitattu 21.10.2020). Saatavilla internetistä: [www.terveysportti.fi](http://www.terveysportti.fi)

Emre U, Bernius M, Roblin PM, Gaerlan PF, Summersgill JT, Steiner P, Schacher J, Hammerschlag MR: *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* 22: 819–823, 1996

Elwell C, Mirrashidi K, Engel J: *Chlamydia* cell biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 14 (6): 385–400, 2016

Flores R, Zhong G: The *Chlamydia pneumoniae* inclusion membrane protein Cpn1027 interacts with host cell Wnt signaling pathway regulator cytoplasmic activation/proliferation-associated protein 2 (Ccapr2). *PLoS One* 10 (5): e0127909, 2015

GeneProof: GeneProof *Chlamydia pneumoniae* PCR Kit (online). GeneProof, Tsekki, 2020 (viitattu 08.10.2020). Saatavilla internetistä [www.geneproof.fi](http://www.geneproof.fi)

Gérard HC, Fomicheva E, Whittum-Hudson JA, Hudson AP: Apolipoprotein E4 enhances attachment of *Chlamydia* (*Chlamydia pneumoniae*) elementary bodies to host cells. *Microb Pathog* 44: 279–285, 2008

Hackstadt T: Initial interactions of *Chlamydiae* with the host cell. Kirjassa: Intracellular pathogens I: *Chlamydiales*. S. 126–128, e-kirja: eISBN: 978-1-55581-732-9. Toim. Tan M, Bavovil P, ASM Press, Washington, USA, 2012

Hakala E, Hanski L, Uvell H, Yrjönen T, Elofsson M, Vuorela PM: Dibenzocyclooctadiene lignans from *Schisandra spp.* selectively inhibit the growth of the intracellular bacteria *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis*. *J Antibiot* 68: 609–614, 2015

Hammerschlag MR: The Intracellular Life of *Chlamydiae*. Semin Pediatr Infect Dis 13 (4): 239–248, 2002

Hanski L, Vuorela PM: Recent advances in technologies for developing drugs against *Chlamydia pneumoniae*. Expert Opin Drug Discov 9 (7): 791–802, 2014

Hanski L, Vuorela PM: Lead discovery strategies for identification of *Chlamydia pneumoniae* inhibitors. Microorganisms 4: 43, 2016

Hanski L, Ausbacher D, Tirola TM, Strom MB, Vuorela PM: Amphipathic  $\beta^{2,2}$ -amino acid derivatives suppress infectivity and disrupt the intracellular replication cycle of *Chlamydia pneumoniae*. PLoS One 11 (6): e0157306, 2016

Hanski L, Kapp K, Tirola TM, Orav A, Vuorela HJ, Pussa T, Vuorela PM: mint flavorings from candies inhibit the infectivity of *Chlamydia pneumoniae*. Nat Prod Commun 11 (11), 1725–1728, 2016

Hegemann JH, Moelleken K: Chlamydia adhesion and adhesins. Kirjassa: Intracellular pathogens I: *Chlamydiales*. S. 97–126, e-kirja: eISBN: 978-1-55581-732-9. Toim. Tan M, Bavovil P, ASM Press, Washington, USA, 2012

Heinemann M, Kern WV, Bunjes D, Marre R, Essig A: Severe *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with neutropenia: case reports and literature review. Clin Infect Dis 31: 181–184, 2000

Hybiske K, Stephens RS: Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. PNAS 104 (27), 11430–11435, 2007

Kabeiseman EJ, Cichos K, Hackstadt T, Lucas A, Moore ER: Vesicle-associated membrane protein 4 and syntaxin 6 interactions at the chlamydial inclusion. Infect Immun 81 (9): 3326–3337, 2013

Karunakaran K, Subbarayal P, Vollmuth N, Rudel T: *Chlamydia*-infected cells shed Gp96 to prevent chlamydial re-infection. Mol Microbiol 98 (4): 694–711, 2015

Kintner J, Lajoie D, Hall J, Whittimore J, Schoborg RV: Commonly prescribed  $\beta$ -lactam antibiotics induce *C. trachomatis* persistence/stress in culture at physiologically relevant concentrations. Front Cell Infect Microbiol 44 (4): 2014

Keuhkoklamydia (online). Infektiaudit. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, Helsinki, 2015 (viitattu 08.09.2020). Saatavilla internetistä: [www.thl.fi/](http://www.thl.fi/)

Kim JH, Jiang S, Elwell CA, Engel JN: *Chlamydia trachomatis* co-opts the FGF2 signaling pathway to enhance infection. PLoS Pathog 7 (10): e1002285, 2011

Kokes M, Valdiva RH: Cell biology of the chlamydial inclusion. Kirjassa: Intracellular pathogens I: *Chlamydiales*. S. 170–186, e-kirja: eISBN: 978-1-55581-732-9. Toim. Tan M, Bavovil P, ASM Press, Washington, USA, 2012

Korhonen JT, Puolakkainen M, Haveri A, Tammiruusu A, Sarvas M, Lahesmaa R: *Chlamydia pneumoniae* entry into epithelial cells by clathrin-independent endocytosis. *Microb Pathog* 52: 157–164, 2012

Kortesoja M, Trofin RE, Hanski L: A platform for studying the transfer of *Chlamydia pneumoniae* infection between respiratory epithelium and phagocytes. *J Microbiol Methods* 171: 105857, 2020

Lucas AL, Ouellette SP, Kabeiseman EJ, Cichos KJ, Rucks EA: The trans-Golgi SNARE syntaxin 10 is required for optimal development of *Chlamydia trachomatis*. *Front Cell Infect Microbiol* 5: 68, 2015

Maass M, Bartels C, Engel PM, Mamat U, Sievers H-H: Endovascular presence of viable *Chlamydia pneumoniae* is a common phenomenon in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 31 (4): 827–832, 1998

Mehlitz A, Rudel T: Modulation of host signaling and cellular responses by *Chlamydia*. *Cell Commun Signal* 11 (1): 90–113, 2013

Miyashita N, Kanamoto Y, Matsumoto A: The morphology of *Chlamydia pneumoniae*. *J Med Microbiol* 38: 418–425, 1993

Mölleken K, Becker E, Hegemann JH: The *Chlamydia pneumoniae* invasin protein Pmp21 recruits the EGF receptor for host cell entry. *PLoS Pathog* 9 (4): e1003325, 2013

Murthy AK, Arulanandam BP, Zhong G: *Chlamydia* vaccine: progress and challenges. Kirjassa: Intracellular pathogens I: *Chlamydiales*. S. 311–312, e-kirja: eISBN: 978-1-55581-732-9. Toim. Tan M, Bavovil P, ASM Press, Washington, USA, 2012

Nagarajan UM: Immune recognition and host cell response during *Chlamydia* infection. Kirjassa: Intracellular pathogens I: *Chlamydiales*. S. 217–222, e-kirja: eISBN: 978-1-55581-732-9. Toim. Tan M, Bavovil P, ASM Press, Washington, USA, 2012

Nagarajan UM: Induction and function of type I IFNs during chlamydial infection. Kirjassa: Bacterial activation of type I interferons. S. 101–102, e-kirja: eISBN: 978-3-319-09498-4. Toim. Parker D, Springer, New York, USA, 2014

Nawrotek A, Guimarães BG, Velours C, Subtil A, Knossow M, Gigant B: Biochemical and structural insights into microtubule perturbation by CopN from *Chlamydia pneumoniae*. *J Biol Chem* 289 (36): 25199–25210, 2014

Nelson DE: The chlamydial cell envelope. Kirjassa: Intracellular pathogens I: *Chlamydiales*. S. 74–76, e-kirja: eISBN: 978-1-55581-732-9. Toim. Tan M, Bavovil P, ASM Press, Washington, USA, 2012

- Olive AJ, Haff MG, Emanuelle MJ, Sack LM, Barker JR, Elledge SJ, Starnbach MN: *Chlamydia trachomatis*-induced alterations in the host cell proteome are required for intracellular growth. *Cell Host Microbe* 15 (1): 113–124, 2014
- Omsland A, Sixt BS, Horn M, Hackstadt T: Chlamydial metabolism revisited: interspecies metabolic variability and developmental stage-specific physiologic activities. *FEMS Microbiol Rev* 38 (4): 779–801, 2014
- Ouellette SP, Rueden KJ, Rucks EA: Tryptophan codon-dependent transcription in *Chlamydia pneumoniae* during gamma interferon-mediated tryptophan limitation. *Infect Immun* 84 (9): 2703–2713, 2016
- Panzetta ME, Valdivia RH, Saka HA: *Chlamydia* persistence: A survival strategy to evade antimicrobial effects *in-vitro* and *in-vivo*. *Front Microbiol* 9: 3101, 2018
- Phillips-Campbell R, Kintner J, Whittimore J, Schoborg RV: *Chlamydia muridarum* enters a viable but non-infectious state in amoxicillin-treated BALB/c mice. *Microbes Infect* 14: 1177–1185, 2012
- Phillips-Campbell R, Kintner J, Schoborg V: Induction of the *Chlamydia muridarum* stress/persistence response increases azithromycin treatment failure in a murine model of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 58 (3): 1782–1784, 2014
- Pokrovskaya ID, Szwedo JW, Goodwin A, Lupashina TV, Nagarajan UM, Lupashin VV: *Chlamydia trachomatis* hijacks intra-Golgi COG complex-dependent vesicle trafficking pathway. *Cell microbiol* 14 (5): 656–668, 2012
- Richards TS, Knowlton AE, Grieshaber SS: *Chlamydia trachomatis* homotypic inclusion fusion is promoted by host microtubule trafficking. *BMC Microbiol* 13: 185, 2013
- Roschik C, Wood H, Caldwell HD, McClarty G: Comparison of gamma interferon-mediated antichlamydial defense mechanisms in human and mouse cells. *Infect Immun* 74 (1): 225–238, 2006
- Roulis E, Bachmann NL, Myers GSA, Huston W, Summersgill J, Hudson A, Dreses-Werringloer U, Polkinghorne A, Timms P: Comparative genomic analysis of human *Chlamydia pneumoniae* isolates from respiratory, brain and cardiac tissues. *Genomics* 106: 373–383, 2015
- Saka HA, Thompson JW, Chen Y-S, Kumar Y, Dubois LG, Moseley MA, Valdivia RH: Quantitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of *Chlamydia trachomatis* developmental forms. *Mol Microbiol* 82 (5): 1185–1203, 2011
- Shima K, Kuhlenbäumer G, Rupp J: *Chlamydia pneumoniae* infection and Alzheimer's disease: a connection to remember? *Med Microbiol Immunol* 199: 283–289, 2010

Skilton RJ, Cutcliffe LT, Barlow D, Wang Y, Salim O, Lambden PR, Clarke IN: Penicillin induced persistence in *Chlamydia trachomatis*: High-quality time-lapse video analysis of the developmental cycle. PLoS One 4 (11): e7723, 2009

Stallmann S, Hegemann JH: The *Chlamydia trachomatis* Ctad1 invasin exploits the human integrin  $\beta 1$  receptor for host cell entry. Cell Microbiol 18 (5): 761–775, 2016

Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marthe R, Arvind L, Mitchell W, Olinger L, Tatusov RL, Zhao Q, Koonin EV: Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. Science 282: 754–759, 1998

Stephens RS, Myers G, Eppinger M, Bavoil PM: Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved. FEMS Immunol Med Microbiol 55 (2): 115–119, 2009

Subbarayal P, Karunakaran K, Winkler A-C, Rother M, Gonzalez E, Meyer TF, Rudel T: EphrinA2 receptor (EphA2) is an invasion and intracellular signaling receptor for *Chlamydia trachomatis*. PLoS Pathog 11 (4): e1004846, 2015

Virok DP, Raffai T, Kókai D, Paróczai D, Bogdanov A, Veres G, Vécsei L, Poliska S, Tiszlavicz L, Somogyvári S, Endrész V, Burián K: Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in *Chlamydia muridarum* and *Chlamydia pneumoniae* infected mouse lung tissues. Front Cell Infect Microbiol 9: 192, 2019

Wang S-P: The Microimmunofluorescence test for *Chlamydia pneumoniae* infection: technique and interpretation. J Infect Dis 181: 421–425, 2000

Wolf K, Fields KA: *Chlamydia pneumoniae* impairs the innate immune response in infected epithelial cells by targeting TRAF3. J Immunobiol 190: 1695–1701, 2013

Wolf K, Fischer E, Hackstadt T: Ultrastructural analysis of developmental events in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells. Infect Immun 68 (4): 2379–2385, 2000